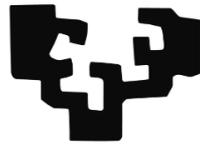


UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO – EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN GONOCÓCICA
EN BILBAO**

TESIS DOCTORAL

URKO IBARGOYEN GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAMÓN CISTERNA CÁNCER

BILBAO, MAYO DE 2017

AGRADECIMIENTOS

*A mi Director de Tesis, el Dr. Ramón Cisterna
por confiar en mí en todo momento.*

*A M^a Carmen Nieto
por apoyarme y ayudarme en todo momento.*

*A todos mis compañeros y compañeras del Servicio
por alentarme cada día.*

*A María del Mar
por estar a mi lado y animarme en todo momento.*

*A mi familia
que me han apoyado muy de cerca desde la distancia.*

ABREVIATURAS

BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
CC	Control de calidad
CDC	Centers for Diseases Control
CDS	Calibrated dichotomous sensitivity
CES	Cefalosporinas de amplio espectro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CTG	Cefalosporinas de tercera generación
DHPS	Enzima dihidropteroato sintasa
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EDO	Enfermedades de declaración obligatoria
EEUU	Estados Unidos de América
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Euro-GASP	The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
GASP	Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
GISP	Gonococcal Isolate Surveillance Project
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
IGD	Infección gonocócica diseminada
ITS	Infección de transmisión sexual
LGV	Linfogranuloma venéreo
LOS	Lipooligosacárido
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacárido
MR	Multirresistencia a los antimicrobianos
OMS	Organización mundial de la salud
PBP	Penicillin-binding proteins
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SDD	Sensibilidad dependiente de dosis
SFHC	Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirido
SIM	Sistema de Información Microbiológica
SNP	Single nucleotide polymorphism
ST	Secuenciotipo

TAAN	Técnica de amplificación de ácidos nucleicos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
UE	Unión Europea
UE/EEE	Estados miembros de la Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNG	Uretritis no gonocócica
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHS	Virus del herpes simple
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
XR	Resistencia extendida a los antimicrobianos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	V
ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE CONTENIDOS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	XIX
A. Índice de figuras	XXI
B. Índice de tablas.....	XXII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Características generales de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3
1.1.2. Estructura de la pared celular	3
1.1.3. Patogénesis e inmunidad	5
1.2. Epidemiología y transmisión	6
1.2.1. Epidemiología en los Estados Unidos de América.....	8
1.2.2. Epidemiología en la Unión Europea.....	9
1.2.3. Epidemiología en España	10
1.3. Manifestaciones Clínicas	11
1.3.1. Infecciones uretrales	11
1.3.2. Infecciones faríngeas y anorrectales.....	11
1.3.3. Infección gonocócica diseminada.....	12
1.3.4. Infección ocular	12
1.3.5. Infección en recién nacidos y niños.....	13
1.3.6. Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis.....	13
1.4. Coinfección con otras infecciones de transmisión sexual.....	13
1.4.1. Virus de la inmunodeficiencia humana	13
1.4.2. <i>Chlamydia trachomatis</i>	14
1.4.3. Micoplasmas	15
1.4.4. Sífilis	16
1.4.5. Virus del herpes simple	17
1.4.6. Virus del papiloma humano	18
1.4.7. Tricomoniasis	19

1.4.8. <i>Haemophilus ducreyi</i>	20
1.4.9. Escabiosis	21
1.4.10. Molluscum	21
1.4.11. Virus de la hepatitis C.....	21
1.4.12. Virus de la hepatitis B	22
1.4.13. Virus de la hepatitis A	23
1.5. Tratamiento de la gonorrea.....	23
1.5.1. Periodo anterior a los antimicrobianos.....	24
1.5.2. Periodo de los antimicrobianos	25
1.5.3. Situación actual del tratamiento.....	29
1.6. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	30
1.6.1. Desarrollo y adquisición de la resistencia antimicrobiana	30
1.6.2. Resistencia a sulfonamidas.....	31
1.6.3. Resistencia a penicilinas.....	32
1.6.4. Resistencia a tetraciclinas	33
1.6.5. Resistencia a espectinomicina	34
1.6.6. Resistencia a quinolonas	34
1.6.7. Resistencia a macrólidos	35
1.6.8. Resistencia a cefalosporinas	36
1.6.9. Respuesta internacional a la evolución de la resistencia y posible emergencia de la gonorrea intratable	37
1.6.10. Perspectivas futuras en el tratamiento de la gonorrea	38
1.7. Diagnóstico de la gonorrea.....	40
1.7.1. Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras.....	41
1.7.2. Diagnóstico presuntivo: microscopía	43
1.7.3. Cultivo e identificación de <i>N. gonorrhoeae</i> (presuntivo y definitivo).....	43
1.7.4. Identificación presuntiva de <i>N. gonorrhoeae</i> después del cultivo.....	44
1.7.5. Confirmación de la identificación de <i>N. gonorrhoeae</i> después del cultivo... ..	45
1.7.6. Diagnóstico molecular	47
1.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	48

1.8.1. Introducción.....	48
1.8.2. Medio de agar recomendado	49
1.8.3. Criterios de interpretación	49
1.8.4. Control de calidad de la determinación de la sensibilidad antimicrobiana..	49
1.8.5. Elección de antibióticos	50
1.8.6. Dilución en agar.....	50
1.8.7. E-test.....	50
1.8.8. Difusión en agar disco-placa	50
1.8.9. Interpretación de los resultados.....	51
1.8.10. Detección de resistencia a penicilina mediada por plásmidos	52
1.9. Tipado de <i>N. gonorrhoeae</i>	53
1.9.1. Técnicas de tipado no basadas en el ADN.....	54
1.9.2. Técnicas de tipado basadas en el ADN	55
1.10. Interés del estudio	58
2. OBJETIVOS.....	59
2.1. Objetivos principales.....	61
2.2. Objetivos secundarios	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
3.1. Diseño del estudio	65
3.2. Selección de las cepas	65
3.3. Características sociodemográficas y datos clínicos de los pacientes	65
3.4. Procesamiento de las muestras.....	66
3.4.1. Tinción de Gram	66
3.4.2. Inoculación e incubación del cultivo.....	67
3.4.1. Identificación de las cepas	67
3.4.2. Estudio de sensibilidad antimicrobiana.....	68
3.4.3 Caracterización de los aislados de <i>N. gonorrhoeae</i>	75
3.5. Análisis estadístico de los resultados.....	78
3.6. Consideraciones éticas	79

4. RESULTADOS	81
4.1. Incidencia de la infección gonocócica	83
4.2. Características demográficas de los pacientes.....	83
4.3. Características de las muestras.....	84
4.4. Sensibilidad antimicrobiana	84
4.4.1. Difusión en agar disco-placa	84
4.4.2. Dilución en agar	86
4.4.3. E-test	87
4.4.4. Aislados multirresistentes y de resistencia extendida de <i>N. gonorrhoeae</i>	88
4.4.5. Correlación entre los diferentes métodos de sensibilidad antimicrobiana ..	89
4.5.1. Clasificación de los secuenciotipos en genogrupos	94
4.5.2. Relación entre secuenciotipos y las características demográficas del paciente	95
4.5.3. Relación entre secuenciotipos/genogrupos y resistencia antimicrobiana....	96
5. DISCUSIÓN	101
5.1. Incidencia de la infección gonocócica	103
5.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	104
5.3. Comparación de técnicas de sensibilidad antimicrobiana	113
5.4. Caracterización molecular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	114
5.4.1. Prevalencia de secuenciotipos y genogrupos.....	114
5.4.2. Relación entre ST y resistencia antimicrobiana.....	116
5.5. Limitaciones del estudio	118
6. CONCLUSIONES	121
7. BIBLIOGRAFÍA	125

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

A. Índice de figuras

Figura 1. Incidencia de la infección gonocócica en el año 2014.

Figura 2. Fórmula desarrollada para calcular la cantidad (en mg) de sustancia valorada necesaria para conseguir la concentración deseada.

Figura 3: Distribución por edad y género de los 253 pacientes cuyas edades estaban disponibles.

Figura 4: Tipos de muestra analizadas en el trabajo. La muestra sanguínea no está representada en el gráfico por su baja presencia (1 muestra, 0,28% del total).

Figura 5. Regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los métodos E-test y difusión en agar disco-placa para azitromicina.

Figura 6. Regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los métodos dilución en agar y difusión en agar disco-placa para cefixima.

Figura 7. Regresión lineal de los resultados obtenidos en los métodos dilución en agar y difusión en agar disco-placa para ceftriaxona.

Figura 8. Regresión lineal de los resultados obtenidos con el método de difusión en agar disco-placa con eritromicina y azitromicina.

Figura 9. ST predominantes observados mediante la técnica NG-MAST.

Figura 10: Distribución de los ST representados por los aislados de *N. gonorrhoeae* resistentes o con sensibilidad intermedia a 2 o más antimicrobianos.

B. Índice de tablas

Tabla 1. Frecuencias de la gonorrea en las regiones de la OMS en el año 2008.

Tabla 2. Incidencia (casos por 100.000 habitantes) de la gonorrea en hombres en el año 2014 en las regiones de la OMS.

Tabla 3. Antibióticos testados en la técnica de difusión en agar disco-placa. Se especifican sus concentraciones, los rangos del control de calidad y los puntos de corte establecidos.

Tabla 4. Antimicrobianos utilizados en el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST.

Tabla 5. Antimicrobianos utilizados en el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por CLSI.

Tabla 6. Puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para la interpretación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a azitromicina.

Tabla 7. Interpretación de la V de Cramer.

Tabla 8. Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 9. Valores estadísticos calculados a partir de los diámetros de halo producidos por los 360 aislados de *N. gonorrhoeae* en presencia de cada antimicrobiano.

Tabla 10. Interpretación de los resultados logrados con el método de difusión en agar disco-placa.

Tabla 11. Distribución de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefixima y ceftriaxona en el periodo de estudio.

Tabla 12. Distribución y CMI de los aislados de *N. gonorrhoeae* con sensibilidad intermedia y resistencia a azitromicina obtenidos mediante el método E-test.

Tabla 13. Distribución de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina en el periodo de estudio.

Tabla 14. Distribución de los aislados de *N. gonorrhoeae* MR de acuerdo a Tribuddharat *et al.* (2017).

Tabla 15. Concordancia categórica entre los resultados obtenidos para azitromicina mediante las técnicas E-test y difusión en agar disco-placa.

Tabla 16: Genogrupos obtenidos y ST que forman cada genogrupo.

Tabla 17: Características de los pacientes de infección gonocócica representados en los ST y genogrupos predominantes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae es una bacteria del género *Neisseria*, el cual cuenta con un total de 28 especies. 10 de ellas están presentes en el ser humano y 2 de ellas, *N. gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, son patógenos humanos estrictos. Las 8 especies restantes están presentes en superficies mucosas de la orofaringe y nasofaringe, y ocasionalmente colonizan las membranas mucosas anogenitales. Su virulencia es limitada y generalmente producen infecciones oportunistas (1).

N. gonorrhoeae es una bacteria Gram negativa, con un diámetro de 0,6 – 1,0 µm. Es un diplococo, es decir, una bacteria esférica que aparece unida en pares. Además, los lados adyacentes de las dos bacterias están aplanados, lo que les da un aspecto de grano de café. Es oxidasa positivo (tiene el enzima citocromo c oxidasa) y catalasa positivo (tiene el enzima catalasa). Produce ácido a partir de la oxidación de glucosa (no mediante fermentación), aunque no puede oxidar otros carbohidratos, lo que ayuda a diferenciar a *N. gonorrhoeae* de otras especies del género *Neisseria*. Es nutricionalmente exigente, ya que requiere de aminoácidos, purinas, pirimidinas, vitaminas y otros nutrientes para su crecimiento. Por lo tanto, crece en medios enriquecidos como el agar chocolate y el agar GC-LECT™, pero es incapaz de crecer en el agar sangre. La temperatura óptima de crecimiento es de 35 – 37°C, y necesita una atmósfera húmeda suplementada con cerca de un 5% de CO₂. Todas estas características hacen que la recuperación de células a partir de las muestras sea complicada, pero el microorganismo puede transmitirse por vía sexual con relativa facilidad (1).

1.1.2. Estructura de la pared celular

La estructura de la pared celular de *N. gonorrhoeae* es la típica de las bacterias Gram negativas, con una fina capa de peptidoglicano entre la membrana citoplasmática interior y la membrana exterior. La pared celular tiene una gran importancia para el gonococo, pues contiene una variedad de proteínas y otras macromoléculas que le ayudan en la patogénesis e inmunidad, las cuales se presentan a continuación (1):

- **Pili:** Los pili están formados por subunidades proteicas repetidas que se extienden de la membrana citoplasmática hasta la membrana exterior. La expresión de los pili está controlada por el complejo de genes *pil*, y están presentes en las especies patogénicas y no patogénicas del género *Neisseria*. Los pili tienen una variedad de funciones, como la unión a las células hospedadoras, transferencia de material genético y movilidad. La expresión de los pili está asociada a la virulencia de *N. gonorrhoeae*, ya que los pili permiten la unión del gonococo a células epiteliales no ciliadas y aportan resistencia frente a los

neutrófilos. Los pili tienen una región conservada en el terminal amino, pero también tienen una región altamente variable en el terminal carboxilo expuesto en el exterior. Este terminal carboxilo puede sufrir fosforilaciones y glicosilaciones, y está asociada a una segunda proteína, PilC, que contribuye a su diversidad antigénica. Esta diversidad, junto a la variación de las fases en la expresión de los pili, contribuye a la falta de inmunidad en los casos de reinfección de *N. gonorrhoeae*. Esto complica los intentos para desarrollar vacunas efectivas contra la gonorrea (1).

- **Porinas:** Las porinas son una familia de proteínas integrales de la membrana exterior que forman poros o canales que permiten el transporte de nutrientes al interior de la célula y la salida de residuos al medio exterior. *N. gonorrhoeae* cuenta con dos genes de porinas: *porA* y *porB*, aunque el primero está silenciado. Por el contrario, la proteína PorB, producida por el gen *porB*, es la principal proteína de la membrana exterior de *N. gonorrhoeae* (supone aproximadamente el 60% de las proteínas de la membrana exterior) y su funcionalidad activa es esencial para la supervivencia del gonococo. PorB es esencial para la virulencia de *N. gonorrhoeae* porque interfiere con la degranulación de los neutrófilos y protege al gonococo de la respuesta inflamatoria de la célula hospedadora. Además, PorB, junto con otras adhesinas, permite la invasión de las células epiteliales por parte del gonococo. Por último, la expresión de algunos antígenos PorB protege al gonococo del sistema del complemento. Aunque puede parecer una diana adecuada para desarrollar una vacuna, su alta diversidad (se expresa como dos clases de antígenos, PorB1A y PorB1B, y cada una tiene varias variantes serológicas) lo convierte en una diana inadecuada (1).
- **Proteínas de opacidad (proteínas Opa):** Son una familia de proteínas de la membrana que participan en la unión a células epiteliales y fagocíticas, además de en la señalización entre células. Los gonococos expresan múltiples alelos de estas proteínas. Las colonias que expresan las proteínas Opa son opacas en los cultivos, de ahí el nombre. Estas colonias son más frecuentes en pacientes con infección localizada (es decir, endocervicitis, uretritis, faringitis y proctitis), mientras que las colonias transparentes son comunes en casos de inflamación pélvica e infecciones diseminadas.
- **Proteínas modificables por reducción (Rpm):** Estas proteínas de la membrana exterior estimulan la producción de anticuerpos bloqueantes que interfieren con la actividad bactericida del suero, protegiendo así al gonococo (1).

- **Receptores del hierro:** El hierro es esencial para el crecimiento y metabolismo de los gonococos. Éstos son capaces de competir con el hospedador humano para captar hierro gracias a receptores específicos de la superficie bacteriana que se unen a la transferrina del hospedador (proteínas de unión a transferrina, Tbp). La especificidad de esta unión es probablemente la razón por la que el gonococo es un patógeno estricto del ser humano. Los gonococos cuentan con otros receptores en la superficie capaces de unirse a otros complejos de hierro del hospedador, como la lactoferrina y la hemoglobina.
- **Lipooligosacárido (LOS):** Es otro antígeno principal de la membrana exterior. Está formado por un lípido A y un núcleo de oligosacárido, pero carece del polisacárido antígeno-O propio de los lipopolisacáridos (LPS). El centro del lípido A posee actividad de endotoxina. *N. gonorrhoeae* libera de forma espontánea vesículas de la membrana exterior durante el crecimiento celular, las cuales contienen LOS y proteínas de la superficie. Las vesículas aumentan la toxicidad mediada por endotoxinas y protegen las bacterias uniéndose a los anticuerpos específicos para proteínas.
- **Otros:** *N. gonorrhoeae* produce una proteasa que corta la región bisagra (“hinge”) del anticuerpo IgA1. Debido al corte se crean fragmentos Fc y Fab inactivos que no afectan al gonococo. Algunas cepas gonocócicas también producen β -lactamasas que pueden degradar la penicilina (1).

1.1.3. Patogénesis e inmunidad

Los gonococos se unen a las células mucosas, penetrando en ellas y multiplicándose. Después atraviesan las células y pasan al espacio subepitelial, donde se produce la infección. Los pili, PorB y las proteínas Opa median la unión y la penetración a las células hospedadoras. Los LOS de los gonococos estimulan la liberación de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), una citoquina proinflamatoria que causa la mayoría de síntomas asociados a la gonorrea (1).

El sistema inmune produce una variedad de respuestas contra la infección gonocócica. Produce una respuesta humoral (basada en las macromoléculas del sistema inmune, como los anticuerpos) mínima contra PorB, pero alta contra las proteínas Opa, pili y LOS. Los anticuerpos producidos son IgA1 e IgG, principalmente el segundo. Además, los anticuerpos producidos contra LOS activan el sistema del complemento, liberando los componentes C5a que tienen un efecto quimiotáctico contra los neutrófilos (1).

Sin embargo, *N. gonorrhoeae* puede suprimir la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos. Se ha observado que puede suprimir la respuesta de las células T CD4 (2,3) y de los anticuerpos producidos por las células B (4) in vitro. Estos efectos están regulados por la unión de las proteínas Opa a la molécula celular de adhesión 1 a los antígenos carcinoembriónicos humanos (“human carcinoembryonic antigen cellular adhesion molecule 1”, CEACAM1) de los linfocitos (2,4). Por otro lado, los LOS sufren variaciones de fase frecuentes en la estructura de su cadena polisacárida lateral, además de sufrir siliaciones (introducción de un grupo silil, R₃Si), lo que aumenta la resistencia del gonococo al efecto bactericida del sérum, pero reduce la capacidad de invasión. Además, los LOS siliados enmascaran parcialmente los PorB de la membrana exterior, reduciendo la capacidad de los anticuerpos monoclonales para unirse a PorB en un 50% (5). Rpm es un inmunógeno potente que causa la producción de anticuerpos IgG e IgA1, pero éstos pueden bloquear la actividad de los anticuerpos bactericidas dirigidos contra PorB y LOS (6). PorB no sufre variaciones de fase como los LOS, pili y proteínas de opacidad, pero puede unirse a C4bp y al factor H, dos proteínas que regulan el sistema del complemento (7–10).

1.2. Epidemiología y transmisión

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia global estimada para la gonorrea fue de 87,7 millones de casos en 2005, 106,1 millones en 2008 (11) y 78,3 millones en 2012 (12). La Tabla 1 resume las frecuencias de la gonorrea en las regiones de la OMS en el año 2008.

Tabla 1. Frecuencias de la gonorrea en las regiones de la OMS en el año 2008 (11).

Región OMS	Incidencia por 1.000 individuos		Prevalencia (%)		Incidencia global (millones de casos)	Prevalencia global (millones de casos)
	Varones	Mujeres	Varones	Mujeres		
África	60,3	49,7	2,0	2,3	21,1	8,2
Américas	27,6	18,5	0,7	0,8	11,0	3,6
Sureste Asiático	37,0	16,2	1,2	0,8	25,4	9,3
Europa	7,0	8,3	0,2	0,3	3,4	1,0
Mediterráneo Este	11,6	8,1	0,3	0,3	3,1	1,0
Pacífico Oeste	49,9	34,9	1,3	1,5	42,0	13,3

De acuerdo a la OMS, la incidencia de la infección gonocócica se ha reducido del año 2008 (106,1 millones) al año 2012 (78,3 millones). Sin embargo, la OMS advierte que los datos de incidencia del año 2012 no pueden compararse con los datos de incidencia estimadas por la OMS en años anteriores debido al uso de diferentes métodos para la realización de la vigilancia epidemiológica (12). La OMS también reportó una incidencia global en hombres de 25,5 casos por 100.000 habitantes en el año 2014. La Tabla 2 presenta los datos de incidencia en hombres en el año 2014 desglosado por regiones de la OMS.

Tabla 2. Incidencia (casos por 100.000 habitantes) de la gonorrea en hombres en el año 2014 en las regiones de la OMS (12).

Región OMS	Países reportando datos	Incidencia (casos por 100.000 habitantes) Mediana (rango)
África	5	50,1 (7,2-238,0)
América	18	29,3 (1,9-153,3)
Mediterráneo Este	6	3,2 (0,9-385,5)
Europa	9	25,5 (2,9-61,2)
Sureste Asiático	4	7,0 (2,4-20,4)
Pacífico Oeste	11	88,6 (0,5-317,1)
Promedio	53	25,2 (0,5-385,5)

Desde 2005 hasta 2008 la tasa de la gonorrea ha aumentado un 21% (11) debido principalmente a los siguientes factores:

- Aumento de la población, aumentando así el número de jóvenes en la población sexualmente activa
- Aumento de las revisiones sobre la población estimada de la gonorrea en todas las regiones globales de la OMS, excepto en Europa y Mediterráneo Este.
- Cambios sociales que han facilitado la propagación de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) y cambios en las medidas de prevención.

La OMS indica que existe una gran incertidumbre sobre las estimaciones regionales y globales de las ETS. Por lo tanto, recomienda centrarse en los siguientes factores para lograr datos de mayor fiabilidad (11):

- **Prevalencia:** Hoy en día se cuenta con pocos estudios de prevalencia de calidad. Son necesarios más estudios de poblaciones urbanas y rurales de bajo riesgo, clasificados por edad y sexo. También se requiere la mejora de los estudios de vigilancia para monitorizar la incidencia.
- **Duración de la infección:** Los factores que determinan el tiempo de duración de la infección son el patógeno, la búsqueda de población susceptible por parte de los servicios de salud y el acceso de la población a dichos servicios. La información limitada que se tiene sobre estos tres factores lleva a que las estimaciones sobre la duración de la infección sean imprecisas.

Esta información ayuda a conocer mejor la carga de las ETS y a mejorar las intervenciones que se realizan contra las mismas, además de lograr más recursos y apoyo político.

1.2.1. Epidemiología en los Estados Unidos de América

La gonorrea es la segunda enfermedad de declaración obligatoria más frecuente en los Estados Unidos de América (EEUU), aunque su incidencia ha disminuido un 74% de 1975 a 1997 gracias a la implantación del programa nacional para el control de la gonorrea a mediados de 1970. La incidencia ha aumentado en el periodo 2009-2012 (de 98,1 a 106,7 casos por 100.000 habitantes), se ha reducido a 105,3 casos por 100.000 habitantes en 2013 y ha aumentado a 110,7 casos por 100.000 habitantes en 2014. Los datos más actualizados corresponden al año 2015, con un total de 395.216 casos, lo que supone una incidencia de 123,9 casos por 100.000 habitantes (13). El aumento de casos observados de 2014 a 2015 es de un 12,80%, y de 2009 a 2015 de un 26,30%. De todos los años estudiados (de 1941 a 2015), la menor incidencia se registró en 2009.

A continuación se presentan los datos epidemiológicos de los EEUU detallados por regiones, género de los pacientes, grupos de edad y etnias (13):

- **Incidencia por regiones:** La Región Sur tenía la mayor incidencia en el año 2015 (146,3 casos por 100.000 habitantes) de entre las 4 regiones, seguida por la Región Oeste (118,0 por 100.000), Centro Oeste (115,7 por 100.000) y Noreste (94,2 por 100.000). De 2014 a 2015 la incidencia ha aumentado en el Oeste (18,1%), Sur (12,6%), Noreste (11,6%) y Centro Oeste (8,9%).
- **Incidencia por géneros:** La incidencia en hombres ha aumentado un 44,2% entre 2011 y 2015 y disminuido un 0,7% en mujeres. Entre 2014 y 2015 ha aumentado

un 18,3% en hombres y disminuido un 6,8% en mujeres. En el año 2015 la incidencia ha sido de 140,9 casos por 100.000 habitantes en hombres y 107,2 en mujeres.

- Incidencia por grupos de edad: En 2015, el 92,7% de los casos de gonorrea fueron detectados en pacientes de entre 15 y 44 años. La mayor incidencia se observó en mujeres de 20-24 años (546,9 casos por 100.000 habitantes), mujeres de 15-19 años (442,2 por 100.000), hombres de 20-24 años (539,1 por 100.000) y hombres de 25-29 años (448,8 por 100.000). De 2014 a 2015, la incidencia ha aumentado en todos los grupos de edad entre 15 y 44 años.
- Incidencia por etnias: La mayor tasa en 2015 pertenecía a los negros (424,9 casos por 100.000 habitantes), seguidos por los americanos nativos (192,8 por 100.000), hispanos (80,5 por 100.000), blancos (44,2 por 100.000) y asiáticos (22,9 por 100.000). Entre los años 2011 y 2015 la tasa ha aumentado en todas las etnias, excepto en los negros (reducción del 4,0%).

1.2.2. Epidemiología en la Unión Europea

En 2014 se reportaron datos de 27 países pertenecientes a la Unión Europea y al Área Económica Europea (UE / EEA). Se reportaron 66.413 casos, un 25% superior a los 52.995 casos de 2013. En 2014 se reportó una incidencia de 20 casos por 100.000 habitantes. El 58% de los casos pertenecían al Reino Unido (14).

- Incidencia por sexo: El ratio hombre/mujer en 2014 era de 2,7:1 (45.328 hombres y 16.490 mujeres). La incidencia de los hombres era de 35 casos por 100.000 habitantes y la de las mujeres 10 por 100.000. El mayor ratio hombre/mujer se reportó en Grecia (14,1:1).
- Incidencia por países: La mayor incidencia en 2014 se reportó en el Reino Unido (60 casos por 100.000 habitantes), Irlanda (28 por 100.000), Dinamarca (20 por 100.000) y Lituania (18 por 100.000). Las tasas más bajas se observaron en Croacia, Chipre, Luxemburgo y Rumanía (todos <1 caso por 100.000 habitantes).
- Incidencia por grupos de edad: Los grupos de edad con mayor incidencia en 2014 fueron los de 15-24 años (38% de los casos) y 25-34 años (34% de los casos). Entre 2004 y 2013 se redujo la incidencia en los menores de 25 años pero aumentó en el resto de grupos. De 2013 a 2014 aumentó la incidencia en todos los grupos de edad.
- Transmisión: Las categorías de transmisión en 2014 eran las relaciones heterosexuales (49% de los casos), hombres que tienen sexo con hombres (HSH) (44%) y desconocidos (7%). Los casos de HSH fueron el 65% de los casos de hombres en 2014.

1.2.3. Epidemiología en España

En España, la información epidemiológica sobre ETS es reportada por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). RENAVE reportó 4.562 casos en 2014, con una incidencia de 9,82 casos por 100.000 habitantes, superior al año 2013 (7,11 por 100.000 habitantes) (15).

La incidencia ha aumentado un 187,01% desde 2005, cuando se informó de 1.155 casos (2,91 por 100.000 habitantes). En 2014, la distribución de la incidencia por comunidades autónomas presenta un rango muy amplio, entre 1,19 y 21,21 casos por 100.000 habitantes. Tal y como se observa en la Figura 1, las tasas de incidencia más elevadas se registraron en Cataluña (21,21 por 100.000 habitantes), Baleares (17,67), Madrid (15,30) y Comunidad Valenciana (9,42). Las más bajas se notificaron en Melilla (1,19), Murcia (1,91), Extremadura (2,19) y Castilla y León (2,53). Ceuta no notificó casos.

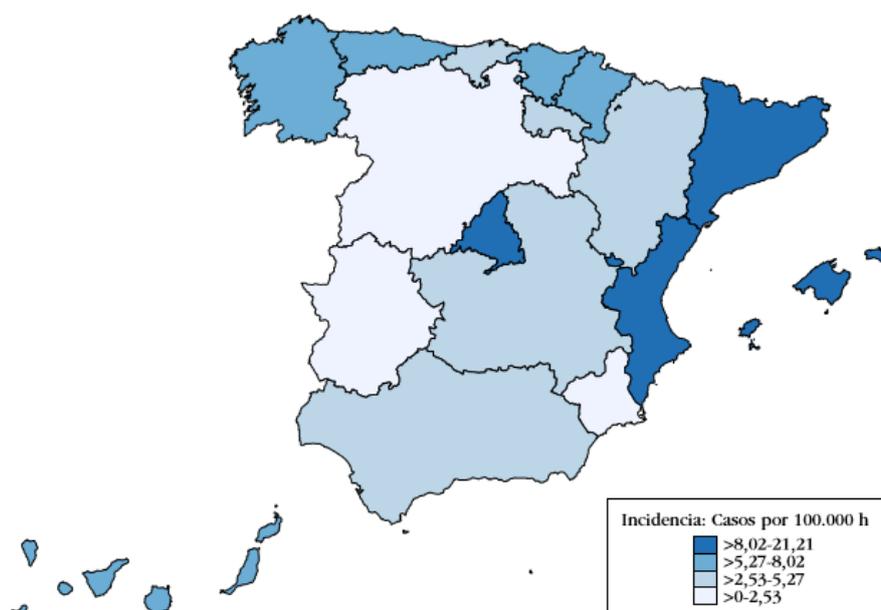


Figura 1. Incidencia de la infección gonocócica en el año 2014 (15).

De los 4.562 casos reportados, solo los aportados por el Sistema de Información Microbiológica (SIM), 1.656 casos, aportan información sobre las características de los casos (15). De estos 1.6561 casos, los hombres representaban el 87,8%, similar al 88,5% del año 2013, y el grupo de edad de 25-34 años representaba el 40,6% de los casos, similar al 40,9% del año 2013.

1.3. Manifestaciones Clínicas

1.3.1. Infecciones uretrales

En hombres, *N. gonorrhoeae* causa uretritis aguda con disuria y secreciones uretrales. El periodo de incubación suele ir de 2 a 7 días. Tras este tiempo, entre el 95% y 99% de los hombres infectados sufre secreciones uretrales purulentas. Cerca del 2,5% de los casos son asintomáticos, y puede ascender al 5% en los casos de gonorrea urogenital. Cuando la infección no es tratada, la mayoría de los casos se solucionan de forma espontánea, pero ocasionalmente pueden producirse complicaciones como epididimitis, linfangitis de pene, prostatitis aguda, absesos periuretrales, vesiculitis seminal, infección de las glándulas de Tyson y las de Cowper y estenosis uretral (16).

En mujeres, la infección se presenta principalmente en el endocérvix, produciéndose una infección uretral concomitante en el 70-90% de los casos. Aunque la infección en mujeres es altamente asintomática (al menos del 50%) (17), tras un periodo de incubación de 8 a 10 días, pueden presentar secreciones cervicovaginales, hemorragia intermenstrual o anormal y dolor pélvico y/o abdominal (16). La infección del epitelio vaginal escamoso es poco común en mujeres postpubertales, y la uretra es la principal zona de infección en mujeres con histerectomías. La infección de las glándulas de Bartolino y las de Skene puede producirse en un tercio de las mujeres con infección genital, y la manipulación cuidadosa de estas glándulas puede proporcionar material purulento para la examinación directa y cultivos. La gonorrea endocervical puede complicar el embarazo y puede causar aborto espontáneo, corioamnionitis, ruptura prematura de membranas, parto prematuro y morbilidad infantil. Los niños nacidos de mujeres infectadas pueden sufrir una infección faríngea o conjuntival (*ophthalmia neonatorum*). La infección puede agravarse en el 10-20% de los casos y puede causar enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) aguda, manifestada como salpingitis (infección de las trompas de Falopio), endometritis y/o absesos tubo-ováricos. Todas ellas pueden resultar en cicatrices, embarazo ectópico, esterilidad y dolor pélvico crónico (18). Los síntomas de EIP gonocócica incluyen dolor abdominal inferior, secreciones y hemorragias cervicales anormales, dolor al moverse, fiebre y leucocitosis periférica. La EIP causada por *N. gonorrhoeae* ocurre generalmente al comienzo de la infección y normalmente durante o poco después del comienzo de la menstruación.

1.3.2. Infecciones faríngeas y anorrectales

N. gonorrhoeae puede causar infecciones faríngeas y anorrectales. Las infecciones orofaríngeas se producen en HSH y mujeres heterosexuales que tienen contactos sexuales orogenitales. Las infecciones orofaríngeas suelen ser asintomáticas,

pero pueden causar faringitis exudativa aguda o amigdalitis con linfadenopatía cervical (19).

La infección anorrectal se produce principalmente en HSH debido al sexo anal sin protección. También pueden sufrirlo las mujeres, pero se debe mayormente a la contaminación perianal debido a secreciones cervicovaginales. La infección rectal suele ser asintomática, pero pueden causar proctitis aguda con dolor anorrectal, secreciones mucopurulentas, hemorragia, “tenesmus” y estreñimiento a los 5-7 días desde el comienzo de la infección (20). La examinación anoscópica del canal anal revela una mucosa rectal edematosa y eritromatosa, además de secreciones purulentas asociadas a las criptas anales.

1.3.3. Infección gonocócica diseminada

En el 0,5-3% de los casos, los gonococos pueden invadir el torrente sanguíneo y causar una infección gonocócica diseminada (IGD) (21). Ésta puede causar diversas infecciones en zonas genitales y extragenitales, y los individuos con deficiencias de componentes del complemento (C7, C8 o C9) pueden sufrir episodios repetidos de IGD (22). La IGD produce fiebre poco intensa, escalofríos, lesiones hemorrágicas en la piel, tenosinovitis, poliartralgias migratorias y artritis franca. Las lesiones de piel suelen producirse en las extremidades, suelen ser dolorosas y aparecen como pápulas que evolucionan en pústulas necróticas en una base eritomatosa. En el 30-40% de los casos, los gonococos del torrente sanguíneo pueden transmitirse a una o más articulaciones y causar artritis gonocócica purulenta y destructiva (23). Las articulaciones afectadas suelen ser las de rodillas, codos, muñecas, dedos o tobillos. Las complicaciones poco comunes de la IGD incluyen endocarditis y meningitis. La endocarditis suele producirse en la válvula aórtica y sigue un curso rápido y destructivo (24), mientras que la meningitis gonocócica tiene las características típicas de la meningitis causada por otros microorganismos. Otras complicaciones son la pericarditis, derrames pericardiales y síndrome de dificultad respiratoria. La IGD puede presentarse de forma atípica en individuos con enfermedades subyacentes, como la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y lupus sistémico eritematoso (25).

1.3.4. Infección ocular

Los recién nacidos de mujeres infectadas con *N. gonorrhoeae* pueden sufrir una infección ocular durante el parto vaginal, conocido como *ophthalmia neonatorum*, pero también se han detectado casos de infección ocular a través de secreciones genitales en adultos (26). Además, el personal de laboratorio puede infectarse accidentalmente si no se protegen los ojos de forma adecuada. La infección ocular causa celulitis periorbital

dolorosa, secreciones purulentas abundantes, inyección conjuntival, edema de los párpados, eritema de los párpados, y queratitis epitelial y estromal. También se han descrito casos de infección ocular producida por *Neisseria cinerea*, así que es esencial la identificación de diplococos gran negativos y oxidasa positivos de muestras oculares (27).

1.3.5. Infección en recién nacidos y niños

La infección en recién nacidos se debe a la contaminación ocular durante el parto vaginal, pero la infección más tardía es indicador de abusos sexuales (28). En niñas, los gonococos causan vaginitis con secreciones en vez de cervicitis, ya que el epitelio de la vagina prepubertal está formada por células epiteliales columnares, aquellas que *N. gonorrhoeae* infecta preferentemente. Al comienzo de la pubertad, estas células vaginales son reemplazadas por el epitelio escamoso estratificado que es menos susceptible a la infección gonocócica. La infección uretral en niños varones es muy similar a la de adultos. Las infecciones faríngeas y rectales son generalmente asintomáticas, como en adultos.

1.3.6. Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis

La perihepatitis asociada a enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), también denominada síndrome de Fitz-Hugh-Curtis (SFHC), es un proceso que afecta a la cápsula hepática y al peritoneo adyacente, bien por infección directa, bien por fenómenos inflamatorios locales mediados por mecanismos inmunes desencadenados por *Chlamydia trachomatis* o *N. gonorrhoeae* (29).

1.4. Coinfección con otras infecciones de transmisión sexual

La infección gonocócica, debido a su corto periodo de incubación, es un buen indicador de prácticas sexuales de riesgo, y frecuentemente se asocia a la transmisión de otras infecciones de transmisión sexual (ITS) concurrentes. Existen más de 30 patógenos bacterianos, virales y parasitarios que se transmiten por vía sexual, aunque algunos de ellos también pueden ser adquiridos por otras vías. El fracaso para frenar la transmisión de la gonorrea también promueve la transmisión de otras ITS tan importantes como la infección por el VIH (30). A continuación se exponen algunas ITS que pueden asociarse a la infección gonocócica.

1.4.1. Virus de la inmunodeficiencia humana

El VIH es un virus que ataca las células CD4 del sistema inmune del cuerpo humano. Si la infección no es tratada, el virus puede destruir tantas células que el sistema inmune no puede defenderse adecuadamente de otras infecciones y enfermedades, como pueden ser las infecciones oportunistas o cáncer. En 2010 se estimó un total de 34

millones de personas con VIH y 2,7 millones de nuevos casos (31). La infección pasa por tres fases:

- **Infección aguda:** Esta fase comienza a las 2-4 semanas desde que se produjo la infección. Durante esta fase se sufren síntomas no específicos, los cuales duran unas pocas semanas, y la concentración de virus en plasma y secreciones genitales es muy alta, por lo que es muy contagioso (32).
- **Latencia clínica:** El virus está activo pero se reproduce a niveles muy bajos. El paciente puede no tener síntoma alguno durante esta fase. La fase puede durar más de una década en individuos no tratados (33), pero en algunos casos progresa rápidamente. Por el contrario, los individuos que están tratados pueden mantener esta fase durante décadas. Al final de la fase la concentración de células CD4 disminuye y la carga viral aumenta.
- **Síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA):** Los pacientes tienen un sistema inmune muy dañado, por lo que tienden a sufrir enfermedades graves. Un individuo con SIDA y sin tratamiento suele vivir alrededor de 3 años, pero con el tratamiento adecuado se puede vivir un tiempo similar a la de cualquier individuo sano (34,35). Los síntomas típicos del SIDA son fiebre, sudor, debilidad y pérdida de peso. En esta fase el virus es muy contagioso por la gran carga viral.

La infección es diagnosticada mediante técnicas que detectan anticuerpos contra HIV-1 y HIV-2 y pruebas virológicas que detectan antígenos o ARN del virus. Se suele realizar un inmunoensayo de anticuerpos o combinación de anticuerpos y antígenos. También se utilizan pruebas serológicas que tienen una alta sensibilidad y detectan todos los subtipos de VIH-1, y muchos de ellos detectan también VIH-2 y variantes poco frecuentes de VIH-1. Sin embargo, estas pruebas suelen dar resultados falsos negativos en la fase aguda de la infección, por lo que se tiende a creer que el paciente no está infectado.

El tratamiento contra el VIH, conocido como terapia antiretroviral (TAR), ayuda a ralentizar las fases de la enfermedad y prevenir el cambio de fases. Además, reduce considerablemente la probabilidad de transmisión del virus. Se cuenta con 25 antiretrovirales divididos en 6 clases aprobados por el “Food and Drug Administration” (FDA), y el tratamiento consiste en la combinación de algunos de ellos (36).

1.4.2. *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis es una bacteria que causa la ETS conocida como clamidiasis. La OMS estimó en 2008 un total de 106 millones de casos nuevos entre adultos, siendo la infección más prevalente junto con la infección gonocócica (11). La mayoría de infectados

por *C. trachomatis* son asintomáticos, pues solo el 10% de los hombres y el 5-30% de las mujeres desarrollan síntomas (37,38). El periodo de incubación no está bien definido, pero los síntomas no suelen aparecer hasta varias semanas después de la infección.

C. trachomatis es transmitida principalmente a través de contactos sexuales, pero puede transmitirse también de una madre al neonato durante el parto, causando *ophthalmia neonatorum* (conjunctivitis) o neumonía en el neonato. En mujeres, la bacteria infecta inicialmente el cérvix, causando los síntomas de la cervicitis (secreciones mucopurulentas endocervicales y hemorragia endocervical), y en ocasiones la uretra, causando disuria, piuria *etc.* La infección puede extenderse al tracto reproductor superior (útero y trompas de Falopio), causando EIP, que puede ser asintomática (EIP subclínica) (39) o aguda, con dolor pélvico y/o abdominal. Los hombres sintomáticos suelen sufrir uretritis, con secreciones uretrales acuosas o mucosas y disuria, y una minoría desarrolla epididimitis (40). La bacteria puede infectar el recto de mujeres y hombres, ya sea por sexo anal o, en el caso de mujeres, desplazándose desde el cérvix y vagina (41,42). La infección anal suele ser asintomática pero puede causar proctitis. Si los ojos de hombres y mujeres tienen contacto con secreciones genitales, pueden sufrir conjuntivitis clamidial (43). La bacteria puede transmitirse a la garganta mediante sexo oral, pero esta infección no está considerada como una causa importante de faringitis (42). En los países en desarrollo está extendido el linfogranuloma venéreo (LGV), otro tipo de ETS causado por diferentes serovares de la misma bacteria, especialmente en HSH (44).

Los métodos de diagnóstico incluyen las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) y cultivos principalmente. Inicialmente se utilizaron pruebas serológicas, pero carecen la sensibilidad y especificidad adecuada. Las TAAN son las pruebas de mayor sensibilidad y especificidad, y permiten la detección simultánea de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en una misma prueba. El tratamiento de elección consiste en azitromicina o doxiciclina. Eritromicina, levofloxacino y ofloxacino son unos antimicrobianos alternativos para el tratamiento.

1.4.3. Micoplasmas

Las micoplasmas son bacterias que carecen de pared celular. *M. genitalium*, *M. hominis*, y las dos especies de ureaplasmas, *U. urealyticum* y *U. parvum*, son las especies de relevancia clínica, aunque todos ellos se encuentran frecuentemente en el tracto urogenital humano.

Las ureaplasmas se encuentran en el 40-80% de las mujeres sexualmente activas y *M. hominis* en el 20-50% (45-47), por lo que se consideran comensales del tracto genital inferior. Sin embargo, estas bacterias se consideran causa de enfermedad en pacientes con deficiencia de células B y niños prematuros. *M. genitalium* causa el 15-20% de uretritis no gonocócica (UNG) y aproximadamente el 30% de uretritis persistente o recurrente (45). También ha sido detectado en el recto, pero su presencia no parece causar síndromes de proctitis clínica. En mujeres, puede ser encontrado en la vagina, cérvix y endometrio, pero es frecuentemente asintomático.

M. genitalium es un microorganismo de crecimiento lento y su cultivo puede durar hasta 6 meses, por lo que las TAAN son el método recomendado. Al carecer de pared celular, los antimicrobianos que atacan la biosíntesis de la pared celular (betalactámicos incluyendo penicilinas y cefalosporinas) no son efectivos contra *M. genitalium*. El antimicrobiano recomendado es azitromicina, pero el número de cepas resistentes a azitromicina está aumentando rápidamente (48). Un tratamiento alternativo es moxifloxacino, que ha logrado tasas de curación del 100% (49,50), pero en Japón, Australia y EEUU se ha informado de casos de tratamientos fallidos (51-54).

1.4.4. Sífilis

La sífilis es una ETS crónica causada por la bacteria *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, un microorganismo espiral. Se transmite mediante contacto directo con úlceras sifilíticas, conocidas como chancro. Los chancros se crean principalmente en genitales externos, vagina, ano y recto, aunque también en labios y boca. La transmisión se produce mediante relaciones sexuales y las mujeres embarazadas pueden transmitirlo al feto.

La sífilis sigue unas fases que pueden durar desde semanas hasta años. La primera es la fase primaria, la cual comienza cuando se detecta el primer chancro, generalmente en la localización donde la bacteria entró en el cuerpo. Esta se produce después de 9-90 días de incubación (17). El chancro se cura en 3-6 semanas con y sin tratamiento, pero de no recibir un tratamiento adecuado, la infección puede pasar a la segunda fase, conocida como fase secundaria. En ella aparecen erupciones cutáneas, principalmente en las palmas de las manos y suelas de los pies, y/o lesiones de membranas mucosas. Otros síntomas de la fase secundaria son fiebre, dolor de garganta, fatiga, pérdida de peso, dolor de cabeza, etc. Estos síntomas desaparecen con y sin tratamiento, pero al no recibir el tratamiento adecuado la infección progresa a la tercera fase, conocida como fase latente. La fase latente se divide en temprana, hasta los 12 meses desde el inicio de la infección, y tardía, a partir de 12 meses. Durante esta fase no hay

síntoma alguno y puede durar varios años. Sin embargo, el 15% de los individuos no tratados pueden desarrollar la última fase, conocida como fase terciaria o tardía, que suele aparecer a los 10-20 años desde que se inició la infección (55). En esta fase la enfermedad puede dañar órganos internos como el cerebro, nervios, ojos, hígado, *etc.* Algunos síntomas son la dificultad para coordinar los movimientos de músculos, parálisis, ceguera gradual y demencia, causando la muerte en algunos casos. Cuando la bacteria invade el sistema nervioso central, conocido como neurosífilis, puede causar una variedad de síntomas similares a otras enfermedades como las enfermedades de Parkinson y Huntington, como dolor de cabeza, alteración del comportamiento y problemas de movimiento.

El método de diagnóstico definitivo de la sífilis es la observación de la espiroqueta mediante microscopía de campo oscuro, aunque su uso es poco frecuente por dificultades tecnológicas. Generalmente se emplean dos tipos de técnicas que analizan muestras de sangre. Los primeros son las pruebas no treponémicas, que detectan anticuerpos producidos contra antígenos no treponémicos que son liberados durante el daño celular causado por la sífilis. Son técnicas sencillas y baratas, pero no son específicas para sífilis y pueden producir falsos positivos (55). Los segundos son las pruebas treponémicas, que detectan anticuerpos específicos contra la sífilis. El diagnóstico recomendado consiste en realizar una prueba treponémica y otra no treponémica.

El tratamiento contra la sífilis consiste en penicilina benzatínica G. Una sola inyección intramuscular (2,4 millones de unidades) puede curar a un individuo con sífilis en estado primario, secundario y latente temprana. Para curar la sífilis latente tardía o latente de duración incierta se administran 3 dosis, uno por semana. Para los alérgicos a penicilina, algunas alternativas son doxicilina, tetraciclina y ceftriaxona (este último para tratar la neurosífilis) (55).

1.4.5. Virus del herpes simple

El herpes genital es una ETS causada por el virus del herpes simple (VHS) tipo 1 (VHS-1) o tipo 2 (VHS-2). Ambos tipos tienen una similitud del 40% del genoma y un 83% de las regiones codificantes de proteínas.

El virus se transmite a través del contacto con lesiones, superficies mucosas, secreciones genitales o secreciones orales. Por lo general, el VHS-2 solo se transmite mediante contactos sexuales con alguien que tenga una infección de VHS-2 genital. Una vez en el cuerpo humano, el virus se replica en células epiteliales y es transportado al ganglio sensorial de dicha localización (17).

El periodo de incubación es de 2-12 días, con una media de 4 días (56). La mayoría de infectados por VHS-1 o VHS-2 son asintomáticos o tienen síntomas muy leves, por lo que la mayoría de los afectados (el 87,4% en EEUU) no son conscientes de la infección (57). En los casos sintomáticos aparecen una o más vesículas en o alrededor de genitales, recto y boca. Las vesículas se rompen y dejan úlceras dolorosas que curan en 2-4 semanas. Las manifestaciones clínicas del herpes genital primario y las recurrentes son diferentes. El episodio primario tiene una lesión herpética de mayor duración y síntomas como fiebre, dolor de cabeza, dolor corporal y nodos linfáticos hinchados (58). Los episodios recurrentes son comunes, especialmente durante el primer año de infección. Los síntomas de los episodios recurrentes son más cortos y menos graves, incluyendo dolor punzante en piernas, caderas y nalgas, además de la erupción herpética. Aunque el virus permanece en el cuerpo de forma indefinida, el número de episodios recurrentes se reduce con el tiempo. Los episodios recurrentes son mucho menos frecuentes en las infecciones genitales por VHS-1 que por VHS-2 (59). Tanto VHS-1 como VHS-2 pueden causar complicaciones en individuos inmunosuprimidos, causando ceguera, encefalitis y meningitis aséptica (58).

Los métodos de diagnóstico incluyen cultivos virales y TAAN. Los cultivos consisten en lograr el crecimiento viral y en la tinción de las células para diferencias VHS-1 y VHS-2, pero los cultivos tienen baja sensibilidad, sobre todo ante lesiones recurrentes. Las TAAN son más sensibles y rápidas, y cada vez son más utilizadas (60). También se cuenta con pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra el virus en muestras de sangre, aunque algunas no diferencian entre VHS-1 y VHS-2, y pueden darse falsos positivos y negativos. Sin embargo, en casos de pacientes sintomáticos, las pruebas serológicas pueden ser empleadas para determinar si se trata de una infección primaria o recurrente. Una infección primaria tendría un resultado positivo virológico y negativo serológico, mientras que la infección recurrente tendría resultados positivos en ambas pruebas (61).

Se recomienda que todas las infecciones de herpes genital primarias sean tratadas con terapia antiviral. Los antivirales recomendados son aciclovir, valaciclovir y famciclovir. El tratamiento consiste en el uso de uno de estos antivirales durante 7-10 días.

1.4.6. Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus icosaédrico sin envoltura con ADN de doble hebra de aproximadamente 8 kb, el cual infecta la piel y superficies mucosas del ser humano. Se han identificado cerca de 100 tipos de VPH y 40 de ellos

pueden infectar el área genital (62). La mayoría de infecciones por VPH son autolimitadas y asintomáticas. La mayoría de gente sexualmente activa se infecta con el VPH al menos una vez en la vida (63,64).

En la mayoría de los casos el VPH no causa problemas de salud, pero en ocasiones puede causar verrugas genitales y cáncer. Entre los tipos de cáncer que puede provocar están el cervical, de vulva, vagina, pene, ano y orofaríngeo. El cáncer puede tardar años, incluso décadas en desarrollarse después de que el individuo adquiera el VPH. Los tipos de VPH que causan las verrugas genitales son los de bajo riesgo, principalmente los tipos 6 y 11. Los que causan cáncer son los de alto riesgo, principalmente los tipos 16 y 18 (65). No existe una forma de saber si una persona con VPH desarrollará cáncer o algún problema de salud, pero aquellos con un sistema inmune débil (por ejemplo, infectados por VIH) tienen una mayor probabilidad. Algunos tipos de VPH, principalmente los tipos 6 y 11, causan papilomatosis respiratoria recurrente, que consiste en la aparición de lesiones en el tracto respiratorio superior, y en ocasiones el inferior, causando una morbilidad y mortalidad significativa (17). Las lesiones son benignas, pero recurren frecuentemente después del tratamiento.

Para el diagnóstico no se utilizan ni cultivos ni pruebas serológicas, pues son poco sensibles. El principal método es la revisión de cáncer cervical, recomendado para mujeres mayores de 30 años, pero no para mujeres menores de 30, hombres y adolescentes. Dado que el VPH es frecuentemente asintomático, la mayoría de personas no saben que lo tienen hasta que desarrollan las verrugas genitales o se les detecta alguna anomalía en las revisiones de cáncer cervical. Algunos no lo descubren hasta que desarrollan problemas de gravedad, como cáncer.

Existe una vacuna efectiva que protege a hombres y mujeres contra las enfermedades causadas por el VPH, cánceres incluidos. El “Centers for Diseases Control and Prevention” (CDC) recomienda que aquellos entre 11 y 12 años sean vacunados (66). También recomienda que las mujeres entre 21 y 65 años asistan a revisiones de cáncer cervical para prevenir su aparición. El tratamiento contra el VPH está dirigido a las lesiones macroscópicas o patológicas causadas por el virus, como las verrugas genitales. No se recomienda el uso de antivirales.

1.4.7. Tricomoniasis

La tricomoniasis es la más común de las ETS curables y es causada por el parásito protozoo *Trichomonas vaginalis*. El parásito se transmite mediante contactos sexuales. En mujeres, la zona comúnmente infectada suele ser el tracto genital inferior (vulva,

vagina o uretra), y en hombres la uretra. El parásito no suele infectar otras partes del cuerpo como la boca y el ano.

Cerca del 85% de los infectados son asintomáticos o sufren síntomas mínimos. Los síntomas suelen aparecer a los 5-28 días tras la infección, aunque pueden aparecer mucho más tarde, e incluyen irritaciones e inflamaciones. Los hombres pueden sufrir síntomas de uretritis, epididimitis o prostatitis. Las mujeres pueden sufrir picores y molestias en los genitales y al orinar, además de secreciones blancas, amarillentas o verdosas. Sin tratamiento, la infección puede durar meses e incluso años (67,68). La tricomoniasis incrementa el riesgo de sufrir otras ETS o transmitirlas a otras personas. Por ejemplo, la tricomoniasis está asociada a una probabilidad 2-3 veces mayor de adquirir VIH (69).

El cultivo era el método de diagnóstico de referencia hasta la aparición de métodos moleculares, por su alta sensibilidad (75-96%) y especificidad (100%) (70). El método más común es la observación por microscopio de preparaciones húmedas de secreciones genitales por su sencillez y bajo coste, pero tiene una baja sensibilidad (51-65%) en muestras vaginales (70,71) y menor aún en muestras de hombres (orina, semen, etc.). Por el contrario, las TAAAN tienen una alta sensibilidad y detectan 3-5 veces más infecciones que la microscopía (72,73).

El tratamiento recomendado consiste en una dosis única de 2 g de metronidazol o tinidazol por vía oral. La alternativa es de 500 mg de metronidazol oral 2 veces al día durante 7 días.

1.4.8. *Haemophilus ducreyi*

El chancroide es una ETS causada por la bacteria *Haemophilus ducreyi* y se transmite exclusivamente por vía sexual. Es siete veces más común en hombres que en mujeres (17). La prevalencia del chancroide ha disminuido desde la década de 1990, aunque aún se pueden dar casos en África y El Caribe (74).

El chancroide produce úlceras en los genitales, generalmente en el surco coronal del pene en hombres y en la vulva en mujeres. También puede producirse chancroide perianal en hombres y mujeres. Raramente, se puede adquirir el chancroide en el laboratorio mediante inoculación accidental de *H. ducreyi* en los dedos.

El periodo de incubación es de 4-10 días. La úlcera genital empieza como una pápula que pustula y ulcera en 2 días. La úlcera es dolorosa, irregular, con bordes socavados y blanda, unas características que lo diferencian de las úlceras sifilíticas. Las

lesiones múltiples son frecuentes y pueden causar úlceras de gran tamaño. Puede ocurrir una adenitis inguinal dolorosa que, de no ser tratada rápidamente, puede causar la ruptura de los nodos linfáticos (bubones).

La combinación de úlceras genitales y adenopatía inguinal supurativa sirve como diagnóstico presuntivo (75), pero el diagnóstico definitivo consiste en la identificación de *H. ducreyi* en cultivo, aunque su sensibilidad es menor del 80% (76). No se cuenta con técnicas de PCR recomendadas, pero algunos laboratorios clínicos utilizando protocolos propios. Los tratamientos recomendados son de azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino o eritromicina.

1.4.9. Escabiosis

La escabiosis está causada por el parásito humano *Sarcoptes scabiei*. La transmisión en adultos se suele producir por vía sexual, aunque no es así en niños (77,78). El parásito se mantiene en la membrana superficial de la piel, donde deposita los huevos. Los principales síntomas de la escabiosis son picor intenso y sarpullidos en la piel. El tratamiento recomendado es de una crema de 5% de permetrin (recomendado para menores) o 200 µg de ivermectin por vía oral. El tratamiento alternativo es una loción de 1% de lindano.

1.4.10. Molluscum

Molluscum es un virus perteneciente a la familia *Poxviridae*. Produce una infección benigna que frecuentemente afecta a niños, pero puede transmitirse por vía sexual. La infección causa pápulas que pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo. Suele curarse en 6-12 meses, pero en ocasiones puede durar hasta 4 años, y puede prolongarse aún más en pacientes inmunodeprimidos. La infección es autolimitada, por lo que el tratamiento podría no ser necesario. Sin embargo, las molestias que se pueden sentir en las relaciones sexuales, y la necesidad de evitar la transmisión hacen conveniente el tratamiento, y es especialmente recomendado si la infección afecta al área genital. El tratamiento consiste en cimetedina oral (en niños), crema de 0,5% podofilotoxina, combinación de yodina y ácido salicílico, potasio hidróxido, tretinoína, cantaridina e imiquimod (79).

1.4.11. Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus que causa una infección del hígado. Existen 6 genotipos del virus, y más de 50 subtipos. Se transmite principalmente mediante exposición percutánea a sangre infectada, como inyección de drogas y donaciones de sangre, aunque éste último ha disminuido drásticamente en los últimos

años por los controles que se realizan. Puede transmitirse también por vía sexual, aunque esa vía es poco eficiente (80,81).

El 20-30% de los infectados recientes sufren fatiga, dolor abdominal, pérdida de apetito e ictericia. Los síntomas aparecen a las 4-12 semanas de media desde la infección. El 70-85% de los infectados desarrolla VHC crónica y el 60-70% de los pacientes con VHC crónica desarrollan enfermedad crónica de hígado, que va de cirrosis a cáncer de hígado. La enfermedad crónica de hígado es generalmente lenta, sin mostrar síntomas durante décadas. De hecho, muchos infectados no descubren la infección hasta que se les realiza algún análisis para donaciones de sangre o se les detecta niveles altos de alanina aminotransferas en exámenes rutinarios.

El diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos contra VHC (inmunoensayos, EIA, *etc.*) seguido de TAAN para detectar el ARN del virus en aquellos con resultado de anticuerpos positivo (82). Los infectados por VIH y baja concentración de células CD4 pueden dar resultados falsos negativos en la prueba de anticuerpos, por lo que se les debería realizar una TAAN independientemente de los otros resultados. Aquellos con resultado positivo en la prueba de anticuerpos deben ser evaluados para analizar la presencia y estado de desarrollo de la enfermedad crónica de hígado.

La respuesta al tratamiento es mayor en pacientes con infección aguda comparados con los de infección crónica. El tratamiento ha evolucionado considerablemente desde la introducción de los inhibidores de proteasas de VHC en el año 2011, y desde entonces se han desarrollado nuevos fármacos con distintos mecanismos de acción.

1.4.12. Virus de la hepatitis B

La hepatitis B está causada por el virus de la hepatitis B (VHB). El periodo de incubación es de 6 semanas a 6 meses. La mayor concentración de virus se encuentra en sangre, con menores concentraciones en otros fluidos corporales como semen, saliva, secreciones vaginales y exudados (83,84). El VHB se transmite por la exposición de membranas mucosas o percutáneas a sangre o fluidos corporales infectados con el virus, como pueden ser el sexo no protegido y la inyección de drogas. También se han reportado infecciones debido a la premasticación y errores en procesos de control de infección en hospitales (85-87).

El VHB puede ser autolimitado o crónico. La mitad de los VHB adquiridos por vez primera son sintomáticos, y aproximadamente el 1% de los casos desarrollan fallo de hígado y muerte (88). El riesgo de adquirir la infección crónica está inversamente

relacionada a la edad: el 30% de los menores de 5 años infectados se convierten en enfermos crónicos, por un 2-6% de adultos infectados (89). Entre los enfermos de VHB crónica, el riesgo de muerte prematura por cirrosis o carcinoma hepatocelular es del 15-25% (90).

El diagnóstico de la infección por VHB aguda o crónica se basa en pruebas serológicas, las cuales pueden diferenciar las infecciones agudas de las crónicas. Respecto al tratamiento, no hay una terapia específica para la infección aguda; la terapia solo es de apoyo. Se cuenta con fármacos que eliminan el virus en casos de infección crónica y remiten la enfermedad de hígado (91). Se cuenta con dos productos que pueden prevenir la hepatitis B: la vacuna contra la hepatitis B y las inmunoglobulinas contra hepatitis B para los casos de posterior exposición (92,93). Esta última suele emplearse como adjunto de la vacuna (en personas previamente no vacunadas) y en personas que no han respondido a la vacunación.

1.4.13. Virus de la hepatitis A

La hepatitis A está causada por la infección del virus de la hepatitis A (VHA). El virus tiene un periodo de incubación de 15-50 días, con una media de 28 días (94). El virus se replica en el hígado y causa una enfermedad autolimitada que no causa infección crónica o enfermedad crónica de hígado. El riesgo de síntomas está directamente relacionado con la edad, pues más del 70% de los adultos muestran síntomas, mientras que la mayoría de menores son asintomáticos. Los anticuerpos que se producen durante la infección persisten durante toda la vida y protegen contra la reinfección (95). La infección se transmite principalmente por vía fecal-oral, pero también por vía sexual.

El diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas. La presencia de anticuerpos IgM anti-VAH es indicativo de infección aguda. El tratamiento de la hepatitis A consiste en cuidado de apoyo, y puede que algunos pacientes tengan que ser hospitalizados, como los que sufren deshidratación por vómitos o fallo de hígado agudo. El mejor método para prevenir la infección es la vacunación. La vacuna se prepara a partir de VHA inactivados, y se administra en 2 dosis, logrando una protección del 100% tras la segunda dosis (96).

1.5. Tratamiento de la gonorrea

El tratamiento de la gonorrea tiene dos objetivos. Por un lado, curar casos individuales para reducir el riesgo de complicaciones de la enfermedad, y por otro lado, prevenir la transmisión de la infección. La historia del tratamiento de la gonorrea se

divide en dos periodos: periodo anterior a los antimicrobianos y periodo de los antimicrobianos.

1.5.1. Periodo anterior a los antimicrobianos

La principal medida frente a la gonorrea en el periodo anterior a los antimicrobianos consistía en llevar un estilo de vida saludable (descanso adecuado, alimentación adecuada, abstención de bebidas alcohólicas, *etc.*), abstención de actividad sexual y diferentes tratamientos como bálsamos, irrigaciones uretrales, componentes químicos e hipertermia (97).

Durante la segunda mitad del siglo XIX la gonorrea era tratada con diferentes sustancias y bálsamos que mantenían el cuerpo fresco, evitaban la irritación y diluían la orina, disminuyendo así los síntomas inflamatorios. La uretritis aguda era tratada mediante irrigación uretral con diluciones de potasio permanganato caliente durante varias semanas (97,98).

A finales del siglo XIX se investigaron varios componentes metálicos como el arsénico, antimonio, bismuto, oro, plata y mercurio para lograr componentes con una mayor actividad antibacteriana. Como resultado, los soldados de la Primera Guerra Mundial utilizaron calomel (cloruro de mercurio) y varios componentes de plata para tratar los casos de gonorrea (97,98). Los componentes de mercurio se popularizaron tras la guerra, como el Mercurocromo-220, que era utilizado como antiséptico del tracto urinario (99). Más adelante se utilizó la hipertermia (alta temperatura corporal) como tratamiento, que consistía en calentar las áreas del cuerpo infectadas. Al principio solo se calentaban las articulaciones inflamadas de los casos de artritis gonocócica, pero al observar que muchos de estos casos solo se recuperaban incluyendo la hipertermia genital, ésta también empezó a utilizarse para tratar las infecciones genitales (100,101). El aumento de la temperatura corporal se lograba mediante una cabina de calor, en la que se introducía todo el cuerpo excepto la cabeza. Se realizaban entre 5 y 6 tratamientos, realizados cada 3 días, de 4-6 horas cada uno (102). La cabina alcanzaba los 41°C y la tasa de curación era del 80-90% (103). Más adelante se utilizó un pretratamiento de mercurocromo en glucosa hipertónica que aumentaba la eficacia de la hipertermia (104). Finalmente, el uso de las cabinas de calor se redujo debido al uso de diversos elementos que aumentaban la temperatura pélvica. Estos elementos se introducían durante 2 horas en la vagina y/o recto de los pacientes y elevaban la temperatura hasta los 44°C (105,106). La hipertermia fue considerada el mejor tratamiento contra la infección gonocócica hasta la llegada de los antimicrobianos (106).

1.5.2. Periodo de los antimicrobianos

Se ha utilizado una gran variedad de antimicrobianos frente a la gonorrea, y varios de ellos siguen siendo utilizados hoy en día. Algunos de ellos son la penicilina, tetraciclina, espectinomicina, quinolonas, macrólidos y cefalosporinas.

1.5.2.1. Sulfonamidas

Las sulfonamidas son la primera familia de antimicrobianos utilizada para el tratamiento de la gonorrea. Su molécula diana es el enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), que participa en la síntesis del ácido fólico en el gonococo. La primera sulfonamida utilizada fue la sulfanilamida, descubierta en 1935 y la cual obtuvo una tasa de curación de entre 80 y 90% en aquel periodo (107–109). Los siguientes fueron la sulfapiridina, que se utilizó entre 1940 y 1941, curando muchos casos donde la sulfanilamida fracasaba (110), y el sulfatiazol, igual de efectivo que el anterior pero mejor tolerado por el cuerpo humano (109,111). A finales de la década de 1940, más del 90% de los gonococos eran resistentes a las sulfonamidas *in vitro* (108,112), pero algunos como el sulfametoxazol continuaron siendo utilizados durante décadas, sobre todo combinados con trimetoprim y en lugares de bajos recursos (98,113–115).

1.5.2.2. Penicilina

La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1928. Este antimicrobiano se une a las proteínas de unión a penicilina (“penicillin binding proteins”, PBP), unas transpeptidasas que participan en la formación de los enlaces cruzados del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. La unión de la penicilina inhibe la actividad de las PBP, causando irregularidades en la pared bacteriana, lo que produce un efecto bactericida.

La penicilina fue utilizada para el tratamiento de la gonorrea en 1930 por primera vez para tratar un caso de oftalmia gonocócica (116). En 1943 se confirmó su efectividad contra la uretritis gonocócica (117,118) y rápidamente sustituyó a las sulfonamidas como tratamiento empírico contra la gonorrea (117,119). Aunque inicialmente tenía una tasa de curación del 95%, las CMI de la penicilina contra cepas gonocócicas aumentaron a lo largo de los años, causando un aumento progresivo de las dosis prescritas para lograr tasas de curación aceptables (98,120). En 1946 se publicaron 4 casos de gonorrea de alta resistencia a penicilina (0,6 a 1,6 millones de unidades) y se observó un aumento del porcentaje de cepas resistentes durante las siguientes 2 décadas (121,122). A pesar del aumento de la resistencia, la penicilina permaneció como una opción efectiva para el tratamiento de la gonorrea durante muchas décadas. Sin embargo, en 1976 se publicaron 2 tipos de plásmidos productores de β -lactamasa que proporcionaban resistencia de alto

nivel a penicilina (123–125). Las cepas que contenían aquellos plásmidos se expandieron rápidamente por todo el mundo, que junto al reporte de una cepa con resistencia a penicilina mediado por cromosomas en Durham, Inglaterra (126), dio fin al uso de la penicilina como tratamiento empírico. Las cepas gonocócicas con resistencia plasmídica y/o cromosómica están hoy en día esparcidas por todo el mundo (114,115,120,127).

1.5.2.3. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son una familia de antimicrobianos de amplio espectro que inhiben la unión del aminoacil-ARNt al complejo ARNm-ribosoma, debido a la unión a la subunidad 30S ribosomal, lo que inhibe la síntesis de proteínas y causa un efecto bacteriostático. La primera tetraciclina utilizada fue la clortetraciclina, descubierta en 1945. Las tetraciclinas se utilizaron sobre todo en pacientes alérgicos a penicilina. Sin embargo, las CMI de las tetraciclinas aumentaron a lo largo de los años debido a los determinantes de resistencia cromosómica (128) y en 1986 se reportaron algunas cepas con resistencia de alto nivel mediada por plásmidos, lo que llevó a la exclusión de las tetraciclinas de las guías clínicas de varios países (129). En la actualidad, estas cepas están esparcidas por todo el mundo (114,115,120).

1.5.2.4. Espectinomicina

La espectinomicina es un aminociclitol estrechamente relacionado a los aminoglicósidos producidos por la bacteria *Streptomyces spectabilis*. Se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e interrumpe la síntesis de proteínas.

A principios de la década de 1960 se comenzó a sintetizar y comercializar la espectinomicina para el tratamiento de la gonorrea, en particular para tratar casos de cepas resistentes a penicilina (130,131). Sin embargo, en 1967 se reportó el primer caso de resistencia en los Países Bajos (132) y en 1981 se reportó el primer caso de resistencia de alto nivel mediado por plásmidos en Filipinas (133). En 1981 se introdujo la espectinomicina como tratamiento empírico para el personal militar de los EEUU en Corea del Sur, pero tras 4 años la tasa de fracaso era del 8,2% (134). En 1983 se reportaron varios aislados resistentes en Londres (Reino Unido) (135). Finalmente, se retiró la espectinomicina en monoterapia como tratamiento empírico de primera línea en todo el mundo.

Hoy en día, la resistencia a espectinomicina es infrecuente en todo el mundo, incluso en Corea del Sur, donde no se ha registrado ningún caso de resistencia desde 2002 a pesar de que siguen utilizando espectinomicina en el tratamiento (136). Sin embargo, el uso de espectinomicina es infrecuente porque se teme que su uso como tratamiento de primera línea pueda extender la resistencia (137,138) y porque la

espectinomina tiene una efectividad subóptima contra la gonorrea faríngea (80% de eficacia) (138).

1.5.2.5. Quinolonas

Las quinolonas son una familia de antimicrobianos de amplio espectro. George Leshner descubrió las quinolonas sintéticas, producidas como producto secundario en la producción de la cloroquina. La primera quinolona utilizada contra la gonorrea fue el ácido nalidíxico, utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (31). Tras el ácido nalidíxico se comenzaron a utilizar las quinolonas de amplio espectro, también conocidas como fluoroquinolonas. Dos de ellas, ciprofloxacino y ofloxacino, han sido utilizados para el tratamiento de la gonorrea, sobre todo ciprofloxacino desde mediados hasta finales de la década de 1980. Los fracasos clínicos reportados en 1990 (139) llevaron al aumento de la dosis del tratamiento y al poco tiempo se reportaron casos de cepas resistentes en la región del Pacífico Oeste (140,141) que se extendieron rápidamente. Como resultado, se retiró el uso de fluoroquinolonas como tratamiento de primera línea en el Pacífico Oeste durante la década de 1990 y en muchos países asiáticos y europeos a partir del año 2000 (120). Además, el CDC retiró las fluoroquinolonas de su lista de tratamientos recomendados contra la gonorrea en 2007, sin excepciones (142). Hoy en día, la resistencia a quinolonas es muy alta en todo el mundo (98,114,115,120,127).

1.5.2.6. Macrólidos

Los macrólidos son una familia de antimicrobianos que tienen un anillo lactona macrocíclico en común, e inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la translocación del aminoacil ARNt. La eritromicina fue el primer macrólido descubierto, aislado del microorganismo *Streptomyces erythraeus* (hoy en día conocido como *Saccharopolyspora erythraea*) en 1952. En 1980 se desarrolló la azitromicina, un derivado sintético de la eritromicina. La eritromicina no resultó ser lo bastante efectiva contra la gonorrea (98,143), pero la actividad de la azitromicina era mayor. Sin embargo, a partir de mediados de la década de 1990 se reportaron casos de sensibilidad reducida y resistencia en América Latina y muchos otros países, sobre todo en aquellos con un amplio uso de la azitromicina contra la gonorrea (14,144–146). Además, se reportaron cepas con resistencia de alto nivel (CMI superior a 256 µg/ml) en varios países europeos ((147–150), EEUU (151), Canadá (152), Australia (153), Argentina (154) y China (155). Hoy en día se sigue utilizando la azitromicina en muchos países, pero no se recomienda su uso como monoterapia empírica debido a la rápida selección de cepas resistentes y los posibles efectos adversos de la dosis oral de 2

g (147). Sin embargo, la azitromicina forma parte de las nuevas terapias antimicrobianas duales contra la gonorrea, principalmente junto a ceftriaxona (156–158).

1.5.2.7. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son una clase de antimicrobianos β -lactámicos que inhiben los enlaces cruzados de los peptidoglicanos de pared celular bacteriana gracias a la unión del anillo β -lactámico a las PBP, causando un efecto bactericida. Giuseppe Brotzu descubrió en 1948 unos componentes bactericidas del hongo *Cephalosporium acremonium*, que tras ser químicamente modificados dieron lugar al cefalotín, una cefalosporina comercializada en 1964 (31). El uso de las cefalosporinas para el tratamiento de la gonorrea se extendió cuando dejó de recomendarse el uso de las fluoroquinolonas, y hoy en día siguen siendo utilizadas. Las principales cefalosporinas utilizadas hoy en día son ceftriaxona (inyectable) y cefixima (oral). Ambas son cefalosporinas de tercera generación (CTG) de amplio espectro (CES) y no se ha descubierto ninguna otra CES de mayor efectividad para el tratamiento de la gonorrea (31). Aunque se cuenta con otras CES orales como cefditoren, celdinir, cefuroxima, cefpodoxima y ceftributen, ninguno de ellos está recomendado para el tratamiento por su eficacia inferior en comparación a cefixima y ceftriaxona (137).

Durante las últimas dos décadas se han reportado cepas gonocócicas resistentes a CES, primero en Japón y después en el resto del mundo. Esto puede deberse, por un lado, al uso excesivo de cefalosporinas orales en Japón debido a que no se utilizaba la ceftriaxona en los tratamientos (159,160) y, por otro lado, a las dosis excesivamente bajas utilizadas en los tratamientos, ya que el uso de concentraciones subinhibitorias de cefalosporinas puede haber ayudado a la selección de cepas resistentes (127,160–162). Como consecuencia, 6 hospitales japoneses reportaron casos de resistencia a cefixima (CMI \geq 0,5 $\mu\text{g/ml}$) y ceftriaxona (CMI \geq 0,5 $\mu\text{g/ml}$) del 30,2% y 0,9% respectivamente en el periodo de 1999-2002 (163), lo que llevó al fracaso del tratamiento en varios casos. Además, se reportaron 8 fracasos de tratamiento con cefixima entre 1999 y 2001 (162) y entre 2002 y 2003 se reportaron 4 fracasos con un régimen extendido de cefixima (164). Como resultado, todas las CES orales fueron retiradas de las guías clínicas de Japón en 2006, siendo sustituidas por otros antimicrobianos como la ceftriaxona y la espectinomicina (165).

Durante los últimos años las cepas con resistencia o sensibilidad reducida a CES se han extendido por todo el mundo (31). En la actualidad se han reportado tratamientos fallidos de cefixima y, esporádicamente a ceftriaxona (principalmente en casos de gonorrea faríngea), en Japón, Australia, varios países europeos, Canadá y Sudáfrica (17,31,166,167).

1.5.2.8. Multirresistencia y resistencia extendida a antimicrobianos

En los últimos años ha aumentado el número de cepas gonocócicas multirresistentes (MR) y con resistencia extendida (XR) detectadas. No existe una única definición de cepas gonocócicas MR y XR, aunque una de las más utilizadas establece que las cepas gonocócicas MR son aquellas resistentes a una clase de antimicrobianos de los recomendados en la actualidad para el tratamiento de la infección gonocócica (CES orales e inyectables, consideradas por separado), además de resistentes a dos clases de los antimicrobianos menos utilizados hoy en día (penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, *etc.*). Las cepas gonocócicas XR son resistentes a dos clases de antimicrobianos de los recomendados en la actualidad para el tratamiento de la infección gonocócica y resistentes a tres clases de los antimicrobianos menos utilizados hoy en día (115).

Las primeras cepas de *N. gonorrhoeae* con XR fueron identificadas por primera vez en Japón (168), Francia (169) y España (170). Sin embargo, no se han detectado más aislados de dichas cepas con XR, lo que puede indicar que las cepas con XR pueden sufrir una reducción en la viabilidad biológica, aunque este aspecto aún se encuentra en investigación (31,171).

1.5.3. Situación actual del tratamiento

El tratamiento de elección en la actualidad consiste en la administración de 250 mg de ceftriaxona intramuscular junto con 1 g de azitromicina oral. Esta terapia dual es la recomendada por el CDC y la OMS para el tratamiento de infecciones uretrales, cervicales, rectales y faríngeas (157,158). Los dos antimicrobianos deben ser administrados el mismo día, preferiblemente simultáneamente. Algunas guías, como la Guía Europea para el Diagnóstico y Tratamiento de Gonorrea en Adultos, también recomiendan dosis de 500 mg de ceftriaxona en la terapia dual (172), aunque de acuerdo al CDC no existen datos clínicos que apoyen esta alternativa (158). Otro tratamiento alternativo consiste en la administración de 400 mg de cefixima oral junto con 1 g de azitromicina oral. Esta terapia solo debe utilizarse como opción alternativa porque los 400 mg de cefixima no ofrecen una actividad bactericida tan alta como los 250 mg de ceftriaxona, además de mostrar una eficacia limitada contra la infección faríngea (158).

En casos de alergia a azitromicina se puede utilizar doxiciclina (100 mg al día, 2 dosis diarias durante 7 días) como segundo antimicrobiano en la terapia dual junto con ceftriaxona o cefixima. En condiciones normales es preferible el uso de azitromicina por su mayor eficacia. En casos de alergia a CES se puede utilizar un tratamiento de espectinomicina en monoterapia (157,158). La espectinomicina es eficaz contra

infecciones uretrales y rectales, pero tiene una baja eficacia contra infecciones faríngeas (137).

1.6. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

N. gonorrhoeae tiene una alta capacidad para alterar su material genético gracias a los procesos de transformación (transferencia parcial o completa de genes de un microorganismo a otro) y mutaciones de todo tipo en su genoma. Mediante estos mecanismos, se adapta con facilidad a las diferentes partes del cuerpo humano. Gracias a estas alteraciones, *N. gonorrhoeae* ha adquirido o desarrollado todo tipo de mecanismos que proporcionan resistencia frente a los antimicrobianos empleados y/o recomendados para el tratamiento de la infección gonocócica (31):

- Destrucción o modificación del antimicrobiano mediante enzimas.
- Modificación o protección de la molécula diana, reduciendo así la afinidad de los antibióticos.
- Reducción del influjo de antimicrobianos.
- Aumento del eflujo de antimicrobianos.

La mayoría de los determinantes genéticos que proporcionan resistencia antimicrobiana en *N. gonorrhoeae* se encuentran en los cromosomas, excepto los genes *bla_{TEM}* (123,125) y *tetM* (129), que se encuentran en plásmidos. Por lo general, la adquisición de un solo determinante aumenta la resistencia antimicrobiana contra un antibiótico a un nivel clínicamente poco significativo, pero la acumulación de varios determinantes y sus complejas interacciones puede aumentar la resistencia a niveles clínicamente significativos, es decir, que cause un fracaso terapéutico. Algunos determinantes pueden incluso llevar al fallo del tratamiento de forma individual (172).

1.6.1. Desarrollo y adquisición de la resistencia antimicrobiana

Los gonococos pueden desarrollar resistencia antimicrobiana mediante los siguientes tres procesos:

- Transformación: Incorporación de material genético desnudo y exógeno en el genoma bacteriano.
- Conjugación: Transferencia de material genético de una bacteria (donante) a otra (recipiente) por contacto directo u otra conexión.
- Mutaciones específicas: Deleciones, inserciones, duplicaciones *etc.*

Hoy en día se sabe que los gonococos han desarrollado la resistencia antimicrobiana por la transferencia de material genético de las especies comensales del género *Neisseria*. Los antimicrobianos empleados en los tratamientos contra la gonorrea y otras

enfermedades han causado la selección de cepas comensales resistentes que han podido transferir los determinantes de resistencia a los gonococos. Esto se debe a que las especies comensales del género *Neisseria* pueden coexistir en el cuerpo humano, sobre todo en casos de gonorrea faríngea asintomática, ya que en ese caso pueden coexistir por largos periodos debido a la dificultad para diagnosticarla (115,120,127,173–175).

Una vez recibidos los determinantes de resistencia, los gonococos pueden propagarse rápidamente, primero en su región geográfica y después globalmente. Además, las distintas cepas gonocócicas pueden transferirse los determinantes mediante procesos de transformación (cromosomas o plásmidos) y/o conjugación (plásmidos), ya que los gonococos tienen un sistema que reconoce tanto su propio ADN como el de especies genéticamente muy relacionadas (176). La transformación de ADN cromosomal es más frecuente que la de plásmidos (10^{-2} μ g ADN cromosomal por 10^8 UFC vs 10^{-6} μ g ADN plasmídico por 10^8 UFC) (177).

Los antimicrobianos actúan uniéndose a una diana que tiene una actividad crítica para la viabilidad de la bacteria. Dicha unión bloquea la función de la diana e induce la muerte celular. Para contrarrestarlo, las bacterias pueden desarrollar resistencias mediante mutaciones que reducen o evitan la unión del antimicrobiano a la diana. Para ello, es necesario que las mutaciones afecten al sitio activo de la diana, lo cual minimiza la afinidad hacia el antimicrobiano, pero al mismo tiempo no deben afectar a la actividad normal de la diana, ya que tendría un impacto negativo en la viabilidad de la bacteria. En el caso de *N. gonorrhoeae*, la mayoría de mecanismos de resistencia microbiana desarrollados y adquiridos no parecen afectar a la viabilidad de la bacteria (posiblemente debido a mutaciones compensatorias) (31), lo que permite la aparición y desarrollo de cepas MR y XR. De hecho, algunos determinantes de resistencia pueden mejorar la viabilidad de cepas gonocócicas específicas (178,179).

1.6.2. Resistencia a sulfonamidas

Las sulfonamidas actúan como inhibidores competitivos del enzima dihidropteroato sintasa (DHPS). Evitan que el ácido p-aminobenzoico se una al DHPS, lo que inhibe la síntesis de ácido fólico en la bacteria. Los gonococos pueden obtener la resistencia frente a sulfonamidas mediante:

- Aumento de la síntesis de ácido p-aminobenzoico, el cual diluye el efecto del agente antimicrobiano (180).
- Alteración del gen *folP*, el cual codifica el enzima DHPS. La alteración causa que el enzima producido tenga una menor afinidad hacia el agente antimicrobiano. Las alteraciones pueden ser mutaciones puntuales o la presencia de un gen

mosaico que contenga secuencias de ADN de especies comensales de *Neisseria* (180–182).

1.6.3. Resistencia a penicilinas

Las penicilinas actúan uniendo el anillo β -lactámico a las PBP, inhibiendo la formación de enlaces cruzados del peptidoglicano en la pared celular de la bacteria, produciendo una actividad bactericida. Los gonococos cuentan con determinantes de resistencia tanto en cromosomas como en plásmidos.

1.6.3.1. Resistencia a penicilinas mediado por plásmidos

Los gonococos resistentes a penicilinas suelen tener el gen *bla*_{TEM-1}, el cual codifica la β -lactamasa de tipo TEM-1. Esta lactamasa hidroliza el enlace amida cíclico de las penicilinas sensibles a lactamasas, abriendo el anillo β -lactámico y anulando la actividad de la penicilina. Los primeros gonococos que contenían plásmidos transportadores de β -lactamasas fueron descritos en 1976 (123,125) y se sospecha que los obtuvieron de *Haemophilus parainfluenzae* mediante conjugación, pues esta bacteria puede transportar un plásmido R similar, el RSF0885 (183). Hoy en día, las cepas gonocócicas transportadoras de β -lactamasas son nombradas por su origen epidemiológico, y dos de ellos (el asiático y el africano) están esparcidos globalmente (114,115).

1.6.3.2. Resistencia a penicilinas mediado por cromosomas

Los gonococos con resistencia a penicilinas mediado por cromosomas pueden mostrar las siguientes mutaciones:

- Mutaciones en el gen *penA*: Es el principal mecanismo de resistencia mediado por cromosomas en gonococos (31). El gen *penA* codifica el PBP2, la principal diana de las penicilinas. Las cepas resistentes pueden contener entre 5 y 9 mutaciones en este gen, lo que reduce la frecuencia de acilación de PBP2, reduciendo la sensibilidad a penicilinas entre 6 y 8 veces (184,185). Estas mutaciones fueron adquiridas mediante procesos de transformación de especies comensales de *Neisseria* (186). La mutación más frecuente es la inserción de un aspartato, llamado Asp345a.
- Mutaciones en el gen *ponA*: Las cepas altamente resistentes a penicilina contienen una mutación con cambio de sentido (“missense”) en este gen. El gen mutado es conocido como *ponA1* y codifica el PBP1, el cual tiene una frecuencia de acilación de penicilina 16 veces menor que el PBP2 salvaje (185,187).

- Mutaciones en el gen *mtrR*: Este gen codifica la proteína MtrR, la cual reprime el sistema de bombas de eflujo de salida MtrCDE. Las mutaciones en este gen reducen dicha represión, por lo que el sistema MtrCDE se sobreexpresa, aumentando el eflujo de antimicrobiano fuera de la célula (127,168,169,188–190).
- Mutaciones en el gen *penB*: Este gen codifica la porina PorB1b de la membrana exterior de la bacteria, y las mutaciones reducen la permeabilidad de las porinas, reduciendo el influjo de penicilina al interior de la célula (127,168,169,190–192).
- Factor X: Este determinante de resistencia no transformable, de identidad aún desconocida, puede aumentar las CMI de penicilina entre 3 y 6 veces (127,168,169,193).

1.6.4. Resistencia a tetraciclinas

Las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S para inhibir la unión del aminoacil-ARNt al complejo ribosoma-ARNm. De este modo inhiben la síntesis de proteínas, causando un efecto bacteriostático.

1.6.4.1. Resistencia a tetraciclinas mediado por plásmidos

El gen *tetM*, productor de la proteína TetM, confiere a los gonococos resistencia de alto nivel frente a tetraciclinas. Debido a su parecido con el factor de elongación G, esta proteína se une a los ribosomas y causa la liberación de las tetraciclinas unidas a los ribosomas. Esto permite que se reanude la síntesis de proteínas que las tetraciclinas habían bloqueado previamente (31). Los plásmidos transportadores de *tetM* se transfieren entre gonococos mediante conjugación.

1.6.4.2. Resistencia a tetraciclinas mediada por cromosomas

La resistencia a tetraciclinas mediada por cromosomas se debe principalmente a la mutación *tet-2*, es decir, un alelo mutado del gen *rpsJ*. Este alelo produce una forma alterada de la proteína ribosómica S10 (194). Se ha sugerido que el alelo *rpsJ* contiene un SNP que altera Val57 a Met57. Val57 se encuentra en el vértice de un bucle de S10, cerca de la región aminoacil-ARNt que forma el sitio de unión a tetraciclinas, y se cree que la mutación Val57 a Met57 reduce la afinidad de la tetraciclina hacia el ribosoma (194).

Al igual que con las penicilinas, los gonococos pueden aumentar el eflujo y reducir el influjo de tetraciclinas mediante los determinantes *mtrR* (188–190) y *penB* (190–192).

1.6.5. Resistencia a espectinomicina

La espectinomicina se une a la subunidad 30S del ribosoma e inhibe la traducción, causando un efecto bacteriostático. Para ser exactos, la espectinomicina interactúa con el 16S ARNr y bloquea la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P durante el proceso de elongación.

Los gonococos pueden obtener la resistencia a espectinomicina mediante las siguientes mutaciones:

- Un polimorfismo de nucleótido único (“single nucleotide polymorphism”, SNP) C1192U en el sitio de unión a espectinomicina de la región de la hélice 34 en el 16S ARNr (195,196).
- Una deleción de Val25 y la alteración K26E en la proteína S5 del ribosoma 30S, codificada por el gen *rpsE* (197), causando resistencia de alto nivel.
- Una mutación T24P en la proteína S5, causando resistencia de bajo nivel (197,198).

La segunda y tercera mutaciones mencionadas se producen en la proteína S5. La terminal N de S5, específicamente los aminoácidos 21-35, forma un bucle que se puede unir a la hélice 34 del 16 ARNr, la cual participa en la unión de espectinomicina al ribosoma (199). La alteración de S5 anula la unión al 16S ARNr, causando la resistencia.

1.6.6. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas bloquean la actividad del ADN girasa y topoisomerasa IV de los gonococos. Estas enzimas separan y unen las hebras de ADN durante el proceso de replicación, por lo que su inactividad lleva a un efecto bactericida. La resistencia antimicrobiana contra las quinolonas se basa en la modificación de ambas enzimas mediante mutaciones en los genes diana:

- ADN girasa: Está formada por dos subunidades GyrA y otras dos subunidades GyrB, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Las subunidades GyrA son las principales dianas de las quinolonas, de modo que las mutaciones en el gen *gyrA* reducen la afinidad de las quinolonas hacia las subunidades GyrA, aumentando la resistencia de los gonococos.
- Topoisomerasa IV: Está formada por dos subunidades ParC y otras dos subunidades ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE* respectivamente. Las quinolonas actúan sobre las subunidades ParC, aunque en menor medida que sobre las subunidades GyrA. Las mutaciones en el gen *parC* reducen la afinidad

de las quinolonas hacia las subunidades ParC, lo que aumenta la resistencia de los gonococos.

Se ha observado que SNP específicos en el gen *gyrA* proporcionan resistencia de nivel bajo-medio a quinolonas, pero para lograr una resistencia de alto nivel son necesarias también unas mutaciones específicas en el gen *parC*. Las mutaciones en ambos genes se pueden lograr con facilidad cuando los gonococos están expuestos a niveles subinhibitorios de ciprofloxacino (una fluoroquinolona) y después los transfieren a otros gonococos por transformación (200). Por otro lado, las mutaciones en los genes *gyrB* y *parE* no parecen proporcionar resistencia frente a ciprofloxacino (201,202).

1.6.7. Resistencia a macrólidos

Los macrólidos se unen a la posición P de la subunidad ribosómica 50S e interactúan con el componente ARNr 23S. De este modo bloquean la translocación del complejo peptidil-ARNt e inducen a liberación de polipéptidos incompletos (203), lo cual produce un efecto bacteriostático. Los gonococos pueden adquirir la resistencia frente a macrólidos modificando el ARNr 23S (mediante metilaciones y/o mutaciones específicas), además de la sobreexpresión del sistema de bombas de eflujo.

- Metilaciones en el ARNr 23S: Las metilasas de ARNr pueden metilar un residuo de adenosina situada en el dominio V del ARNr 23S, bloqueando la unión del macrólido. Los genes productores de metilasas de ARNr (conocidos como genes B de resistencia a macrólido-lincosamina-estreptogramina, o genes *erm*) son transportados por transposones conjuntivos y proporcionan resistencia de alto nivel a eritromicina y de bajo nivel a azitromicina (204,205). Sin embargo, en los últimos años los genes *erm* han sido poco frecuentes entre los gonococos resistentes a macrólidos (147,206).
- Mutaciones específicas en el ARNr 23S: Estas mutaciones pueden proporcionar resistencia de bajo nivel (mutación C2611T) (207) y de alto nivel (mutación A2059G) (147,150,151,154,207) a eritromicina y azitromicina. El nivel de resistencia depende de cuantos de los cuatro alelos de ARNr 23S contengan la mutación (a mayor número de alelos mutados, mayor resistencia). Las cepas con un solo alelo mutado son igual de sensibles que las cepas salvajes, aunque pueden desarrollar resistencia de alto nivel si son expuestos a concentraciones subinhibidoras de macrólidos (147).

- Sobreexpresión del sistema de bombas de eflujo: Los sistemas MtrCDE (208,209), MacAB (210) y los codificados por el gen *mef* (204,205,211) pueden aumentar las CMI de los macrólidos.

1.6.8. Resistencia a cefalosporinas

Las cefalosporinas unen su anillo β -lactámico a las PBP, inhibiendo los enlaces cruzados de los peptidoglicanos de la pared celular de la bacteria, lo que tienen un efecto bactericida. Los gonococos adquieren la resistencia a cefalosporinas mediante mutaciones que modifican los PBP, aumento de eflujo de cefalosporinas y reducción de influjo de cefalosporinas.

Los principales determinantes de resistencia a CES son las alteraciones específicas en el gen *penA*, el cual codifica el PBP2, la principal diana de las CES y penicilinas (127,168–170,190,193). Sin embargo, las alteraciones que proporcionan resistencia a las CES son diferentes de las que proporcionan resistencia a penicilinas (127,168,212). La resistencia a CES se logra mediante un alelo *penA* mosaico que produce una proteína con entre 60 y 70 aminoácidos alterados. Se cree que estos genes mosaicos han surgido mediante procesos de transformación y recombinación de genes *penA* parciales, especialmente los de especies comensales de *Neisseria* que residen en la orofaringe (127,213). Estas especies probablemente han transferido los genes *penA* parciales o totales durante infecciones gonocócicas de la faringe (115,127,173). Este alelo mosaico aumenta en mayor medida las CMI de cefixima que las de ceftriaxona (168,169,190,193) debido a relaciones estructura-función, ya que la cadena lateral C-3 del esqueleto cefem de la ceftriaxona es de mayor longitud (127,212–214). Algunas de las principales mutaciones de la proteína producida por el alelo mosaico *penA* (G545S, I312M y V316T) aumentan la resistencia a cefixima (213,214), aunque solo aumentan la resistencia a nivel clínico en presencia de mutaciones adicionales del alelo mosaico *penA* (127,193). Otra alteración relevante es N512Y, que reduce la sensibilidad a CES, aunque no a penicilinas.

Respecto a los gonococos con resistencia de alto nivel a todas las CES, la primera cepa fue descrita en Kyoto (Japón) y contenía 12 aminoácidos diferentes del alelo *penA* mosaico X, el cual está asociado con la mayoría de los primeros tratamientos con cefixima fallidos en Japón (168). Recientemente se ha comprobado que tres de estas mutaciones (A311V, V316P, y T483S) aumentan de forma significativa las CMI de ceftriaxona y cefixima (215). También se han aislado cepas resistentes a ESC en Francia (169) y España (170). Ambos aislados pertenecen al secuenciotipo (ST) multilocus ST1901 y al ST NG-MAST ST1407 (216), que ha sido identificado como una cepa MR que

presenta una gran proporción de cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a CES (127). Ambas cepas contenían también un alelo tipo XXXIV del gen *penA* mosaico (168) con una alteración A501P adicional, el cual proporciona resistencia de alto nivel a ceftriaxona y cefixima (169,170).

Aunque las alteraciones específicas de la diana PBP2 supongan el principal mecanismo de resistencia contra cefalosporinas, los gonococos también cuentan con los determinantes de resistencia *mtrR* y *penB*, que aumentan el eflujo y reducen el influjo de cefalosporinas respectivamente (127,168,188–192,217). Ambos mecanismos aumentan en mayor medida las CMI de ceftriaxona que las de cefixima, lo que sugiere que ésta última no es un sustrato ideal para el sistema de bombas de eflujo MtrCDE ni la porina PorB1b (190). Al igual que para las penicilinas (185), se ha observado la transferencia de estos determinantes cromosómicos de resistencia (190).

Hoy en día las CES son los antimicrobianos de referencia en muchos países, por lo que es necesario que se conozcan las causas que llevan a los gonococos a adquirir resistencia de alto nivel frente a ellos. Para ello se deben utilizar la mutagénesis directa y estructuras de cristal de las formas alteradas de PBP2 de las cepas resistentes a CES, para así detectar mutaciones específicas y reducciones en la frecuencia de acilación, además de cómo se preserva la función transpeptidasa al mismo tiempo. Finalmente, se debe investigar la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de dichos gonococos.

1.6.9. Respuesta internacional a la evolución de la resistencia y posible emergencia de la gonorrea intratable

La evolución de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, particularmente la resistencia a ceftriaxona, junto con la resistencia conservada a todos los antimicrobianos previamente utilizados en la terapia antimicrobiana, ha causado una gran preocupación a nivel global debido a la posibilidad de que la gonorrea se vuelva muy difícil de tratar e incluso intratable en ciertas circunstancias (31). Como consecuencia, las nuevas guías han introducido la terapia dual como tratamiento de primera línea contra los casos de gonorrea faríngea y anogenital no complicada (157,158). Los nuevos tratamientos consisten en 250 mg de ceftriaxona intramuscular junto con 1 g de azitromicina oral, aunque algunas guías recomiendan también dosis de 500 mg de ceftriaxona (218,219) y 2 g de azitromicina (218). Además, la OMS (220), la CDC americana (221) y la CDC europea (“European CDC”, ECDC) (222) publicaron en 2012 planes de respuesta globales y regionales respectivamente, para controlar y mitigar la propagación de gonococos MR. Uno de los principales objetivos de estos planes de acción es la mejora de los estudios de vigilancia de gonococos resistentes a antimicrobianos y/o

tratamientos de gonorrea fallidos (solo cuando se hayan utilizado tratamiento recomendados) a nivel local, nacional e internacional.

La OMS estableció en el año 1990 el programa global “Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme” (GASP) que fue relanzado en 2009. Los objetivos de este programa incluyen monitorizar las tendencias de las resistencias antimicrobianas (incluyendo diferencias entre regiones), identificar resistencias emergentes e informar de los tratamientos recomendados contra la infección gonocócica. Para ello es crucial que se conserven los cultivos de gonococo en los laboratorios y que se realice una vigilancia epidemiológica en todo el mundo. Además, requiere una voluntad política y una importante financiación para invertir en la infraestructura de los laboratorios y en personal entrenado. Todos los planes resaltan la importancia de acciones globales que disminuyan la carga de infecciones gonocócicas mejorando la prevención temprana, el diagnóstico, la búsqueda de contactos, el tratamiento y la vigilancia epidemiológica de los casos diagnosticados (220). Este compromiso debe combinarse con estrategias que controlen el correcto uso y selección de antimicrobianos y una mayor conciencia entre microbiólogos, epidemiólogos y clínicos. Por otro lado, los planes deben dirigirse principalmente a las poblaciones de mayor riesgo como los HSH, trabajadores sexuales *etc.*, y al tratamiento de la gonorrea faríngea, ya que es difícil de erradicar y supone un reservorio asintomático para la transmisión de la enfermedad y la aparición de resistencias. Por desgracia, los planes GASP están incompletos en algunas regiones como América Latina y el Caribe (144,223) o inexistentes en otras regiones como Europa del Este, Asia Central y África (224–226), donde la frecuencia de la infección gonocócica es mayor.

1.6.10. Perspectivas futuras en el tratamiento de la gonorrea

Hoy en día, el régimen de tratamiento antimicrobiano de ceftriaxona junto con azitromicina, actualmente introducido en los EEUU y Europa, parece ser altamente efectivo y debería ser considerado como una opción en cualquier región donde los estudios de vigilancia de resistencias antimicrobianas sean insuficientes o no recomienden cualquier otro régimen de tratamiento (227). Sin embargo, este tratamiento presenta algunos inconvenientes:

- La sensibilidad a ceftriaxona se ha reducido en los últimos años a nivel global.
- La resistencia a azitromicina es prevalente en muchas regiones y emerge rápidamente en las regiones donde se usa con frecuencia.
- Se han reportado cepas gonocócicas altamente resistentes a azitromicina (CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) de un número cada vez mayor de países.

- Se conocen cepas gonocócicas de sensibilidad reducida o resistencia tanto a ceftriaxona y azitromicina que circulan a nivel global.
- La terapia antimicrobiana dual puede no ser económicamente asumible en regiones con pocos recursos. Además, dichas regiones suelen ser las que sufren un mayor número de casos de gonorrea.

Teniendo en cuenta estos factores, no parece que el tratamiento de ceftriaxona junto con azitromicina vaya a ser una solución a largo plazo (120,127,227). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos (u otros componentes terapéuticos) que permitan una monoterapia efectiva, o al menos que se puedan incluir en nuevas terapias duales. Por ejemplo, un estudio evaluó la efectividad de tratamientos duales de gentamicina intramuscular (una dosis de 240 mg) más azitromicina oral (una dosis de 2 g) y gemifloxacina oral (una dosis de 320 mg) más azitromicina oral (una dosis de 2 g). El primer tratamiento fue efectivo (cura del paciente) en el 100% de los pacientes, y el segundo en el 99,5%. Pese a que los efectos adversos fueron frecuentes en ambos tratamientos (300), cualquiera de los dos podría ser utilizado en casos de resistencia a ceftriaxona, fracaso de la terapia dual o alergias a CES (158).

Algunos antimicrobianos que podrían ser de interés en el futuro para el tratamiento de la gonorrea son los siguientes:

- **Espectinomicina:** Hoy en día la sensibilidad a espectinomicina es muy alta en todo el mundo, incluso en Corea del Sur, donde se ha utilizado de forma frecuente en los últimos años (136). Sin embargo, no es efectiva contra infecciones faríngeas y no está disponible en muchos países (172).
- **Gentamicina:** Se ha utilizado por vía parenteral como tratamiento de primera línea durante los últimos 20 años en Malawi sin que se haya observado resistencia *in vitro* (228), además de que la sensibilidad *in vitro* de este antibiótico es alta en Europa (229). Sin embargo, la gentamicina no se ha utilizado en Malawi como monoterapia, si no que junto a la doxicilina en el tratamiento de infecciones urogenitales. Además, no se cuenta con información de la efectividad del tratamiento en casos de gonorrea faríngea y anorectal. Por último, el tratamiento de dosis única de gentamicina logro un 91,5% de efectividad en un meta-análisis reciente (230). No obstante, no se cuenta con datos que relacionen las CMI de gentamicina y los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos con los resultados del tratamiento, por lo que no se dispone de puntos de corte de resistencia de referencia.
- **Solitromicina:** Es una fluoroquinolona oral que recientemente ha demostrado tener una alta actividad *in vitro* contra gonococos, incluso contra los resistentes

a CES, los XR y los MR (231). Un estudio reciente logró curar al 100% de pacientes con una dosis única de 1,2 g o 1,0 g de solitromicina (232), pero se ha observado que las cepas con alta resistencia a azitromicina (CMI $\geq 256 \mu\text{g/ml}$) muestran resistencia a solitromicina (231).

- **Ertapenem:** Es otro antibiótico que ha mostrado una alta actividad contra los gonococos, incluidos los MR y los XR. Sin embargo, los determinantes de resistencia a CES (alelos mosaicos *penA*, *mtrR* y *penB*) aumentan las CMI de ertapenem (233).

Estos 4 antimicrobianos podrían ser una opción de futuro para el tratamiento de la gonorrea, aunque probablemente no para monoterapias de primera línea. En cambio, podrían ser utilizados en terapias extremas contra cepas resistentes a ceftriaxona y como parte de terapias duales (31).

Además, se han desarrollado derivados de los antimicrobianos previamente utilizados en el tratamiento de la gonorrea. Es el caso de la tigeciclina (derivado de la tetraciclina), eravaciclina (análogo sintético de la tetraciclina), dalbavancina (lipoglicopéptido semisintético), avarofloxacín y delafloxacín (fluoroquinolonas de amplio espectro), SM-295291 y SM-369926 (carbapenems 2-acilos de amplio espectro), los cuales han mostrado ser efectivos *in vitro* contra diversas cepas (31). Sin embargo, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a todos los antimicrobianos utilizados como terapia de primera línea, por lo que cabe esperar que desarrolle resistencias contra los derivados de aquellos antimicrobianos. Por lo tanto, para lograr un tratamiento adecuado en el futuro sería necesario el desarrollo de antimicrobianos que ataquen nuevas dianas y componentes que inhiban el desarrollo de resistencias en otros. Algunos ejemplos que se han utilizado *in vitro* contra gonococos son los nanomateriales citotóxicos (234), inhibidores de los sistemas de bombas de eflujo (235,236) y moléculas que imitan la actividad de las defensas del hospedador (237). Por último, el producto IL-12 NanoCap (TherapyX Inc.) es una formulación de la interleucina 12 humana que podría ser utilizado como vacuna contra *N. gonorrhoeae* en un futuro.

1.7. Diagnóstico de la gonorrea

Un diagnóstico eficaz es esencial para poder administrar un tratamiento antimicrobiano efectivo al paciente. El diagnóstico de la gonorrea consiste en la detección de la bacteria *N. gonorrhoeae* o su material genético, ya sea en muestras genitales o extragenitales. Para el diagnóstico son esenciales diversas técnicas de laboratorio, pues el diagnóstico sin el uso de estas técnicas es complicado por las siguientes razones (17):

- La infección gonocócica es asintomática en muchas ocasiones, sobre todo en mujeres, en la faringe y en el recto.
- Los síntomas, suponiendo que aparezcan, suelen ser muy inespecíficos.

1.7.1. Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras

Las localizaciones adecuadas para la toma de muestras dependen de varios factores como la edad, orientación sexual, manifestaciones clínicas y los métodos de diagnóstico que se vayan a realizar. Dependiendo del género, las prácticas sexuales y método de diagnóstico, las muestras se deben tomar de las siguientes localizaciones:

- Mujeres: Canal endocervical para microscopía y cultivos. Canal endocervical o vagina para TAAN. Algunas localizaciones secundarias incluyen la uretra, recto y orofaringe.
- Hombres heterosexuales: Uretra para microscopía y cultivos. Orina para TAAN.
- Hombres y Mujeres con signos clínicos indicativos y/o prácticas sexuales anales y orales: Además de las muestras mencionadas en los anteriores puntos, se deben tomar también muestras del recto y orofaringe.

Para la obtención de la muestra se utilizan torundas de plástico o alambres flexibles con punta de rayón (viscosa), dacron (tereftalato de polietileno) o alginato cálcico con medio de transporte tipo Stuart-Amies. Se deben evitar las torundas de madera y punta de algodón y el uso de antisépticos, analgésicos y lubricantes a base de aceites, ya que contienen ácidos grasos saturados que pueden ser tóxicos para el microorganismo. La toma de muestras debe realizarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.

La OMS ha publicado las instrucciones para tomar muestras de diferentes localizaciones anatómicas:

- **Endocérvix:** Se inserta una torunda unos 2-3 cm en el canal endocervical y se frota generosamente durante 5-10 segundos. No se recomienda la toma de estas muestras en niñas en prepubertad y mujeres con histerectomía. En estos casos, se deben tomar las muestras del vestíbulo vaginal.
- **Uretra:** Se deben tomar las muestras al menos 1 hora después de que el paciente haya orinado, tomando la secreción o el exudado. Si no se logra, se inserta una torunda unos 2-3 cm en la uretra y se frota generosamente durante 5-10 segundos. En mujeres se realiza la misma técnica, pero antes se masajea la uretra contra la sínfisis púbica.

- **Vagina:** Las muestras vaginales solo se toman para TAAN. Se frota la torunda contra las paredes vaginales posteriores durante cinco segundos. Las torundas vaginales pueden ser tomadas tanto por el paciente como por el clínico (238,239).
- **Recogida de la primera orina:** Solo se toma para TAAN. Es necesario que el paciente no se haya lavado el área genital. Se toman los primeros 10-20 ml de orina evacuados en un contenedor estéril al menos una hora después de la micción anterior.
- **Recto:** Se inserta una torunda unos 2-3 cm en el recto y se frota generosamente contra las paredes del recto durante 10 segundos. Si la torunda se contamina con heces, se descarta y se utiliza una nueva. En pacientes sintomáticos, el uso de un proctoscopio para la toma de muestras anorrectales aumenta el rendimiento de los cultivos.
- **Orofaringe:** Se frota la torunda en la zona faríngea posterior por encima del borde inferior del paladar blanco y las criptas de las amígdalas.
- **Conjuntiva:** Se retrae el párpado inferior y se desliza una torunda a través de la superficie de la conjuntiva palpebral inferior hacia la esquina mediana del ojo.

Los gonococos son muy sensibles a las condiciones ambientales (temperatura, desecación, oxidación y sustancias tóxicas), de modo que el transporte de las muestras de la clínica al laboratorio reduce la viabilidad del microorganismo. Para evitar esto, en medida de lo posible, se debe escoger un método de transporte óptimo, que se basa en la inoculación de las muestras en medios de cultivos nutritivos y selectivos. La inoculación debe realizarse en el cuarto de consulta.

Este método puede no ser posible siempre. En esos casos, las muestras deben introducirse en medios de transporte no nutritivos como Stuart o Amies, o inocularse en sistemas de transporte nutritivos como Transgrow, Jembec, Gono-Pak o InTray GC. Si las muestras son transportadas en medios de transporte no nutritivos, la tasa de aislamiento tras el transporte de muestras a temperatura ambiente (20-25°C) es aproximadamente del 100% durante las primeras 6 horas y superior al 90% hasta las 12 horas (17). Tras 48 horas de transporte, sin embargo, la recuperación de gonococos ya no es posible. Por lo tanto, si el tiempo de transporte va a superar las 48 horas, se deben utilizar sistemas de transporte nutritivos que incorporan un medio de cultivo con una atmósfera con una concentración de CO₂ apropiada, las cuales permiten una tasa de recuperación lo mayor posible (17).

1.7.2. Diagnóstico presuntivo: microscopía

El diagnóstico presuntivo de la gonorrea consiste en la observación de la muestra a través del microscopio. Con un objetivo 100x se observan diplococos Gram negativos dentro de leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Esta técnica es rápida y sencilla. Es una técnica efectiva en casos de hombres con uretritis purulenta, ya que en estos casos la observación de diplococos Gram negativos en el citoplasma de los LPMN tiene una alta especificidad (>99%) y sensibilidad (>95%) (240). Sin embargo, pueden aparecer falsos positivos y la especificidad de la microscopía puede variar dependiendo de la experiencia del microbiólogo. Además, la microscopía tiene menor sensibilidad en hombres asintomáticos e infecciones endocervicales, y no se recomienda su uso para el diagnóstico de infecciones rectales y faríngeas, ya que en este tipo de muestras se puede encontrar una gran variedad de microorganismos saprófitos que disminuyen la sensibilidad de la técnica.

1.7.2.1. Control de calidad de la microscopía

El control de calidad se debería realizar utilizando diferentes reacciones de Gram en un número de bacterias control. Este proceso se debería realizar al empezar un nuevo lote de reactivos.

1.7.3. Cultivo e identificación de *N. gonorrhoeae* (presuntivo y definitivo)

1.7.3.1. Cultivo de las muestras

Cuando las muestras llegan al laboratorio, éstas son cultivadas. Para ello se utilizan medios de cultivo de agar chocolate, que incluyen heminas y factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de los gonococos. También se pueden utilizar medios selectivos y nutritivos como el Thayer-Martin (241), Thayer-Martin modificado y el agar New York City (NYC) (242). Algunos de los medios selectivos contienen 3-4 mg/L de vancomicina que puede inhibir el crecimiento de hasta el 5% de los gonococos de las muestras (243), por lo que se recomienda el uso de medios de cultivo con concentraciones reducidas de vancomicina (2 mg/L) o lincomicina (1 mg/L) para el cultivo de muestras urogenitales. Para el cultivo de muestras rectales y faríngeas es preferible el uso de medios con concentraciones de vancomicina normales (3-4 mg/L).

El rendimiento de un cultivo para el diagnóstico de la gonorrea está condicionado por los siguientes factores:

- Número de localizaciones anatómicas de las que se han tomado las muestras.
- Técnica y torundas utilizadas para la toma de las muestras.
- Condiciones y duración del transporte.

- Composición y calidad del medio de cultivo.
- Condiciones de inoculación e incubación.
- Reactivos y técnicas utilizadas para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

1.7.3.2. Control de calidad del medio de cultivo

Se debe realizar un control de esterilidad a todos los lotes. También se debe analizar la eficacia del medio para el crecimiento de los gonococos y para la inhibición de microorganismos contaminantes. En las pruebas de control se deben utilizar las cepas de referencia de la OMS (196) o la cepa ATCC 49226 descrita por el CLSI (244). Para controlar la inhibición de otros microorganismos, se pueden utilizar otras cepas de referencia como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Neisseria sicca* ATCC 9913 y *Candida albicans* ATCC 14053.

1.7.4. Identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* después del cultivo

Se puede realizar una identificación presuntiva de colonias con apariencia de gonococo que hayan crecido en el medio de cultivo selectivo. Para ello se realizarán una tinción Gram y la prueba de la oxidasa.

La prueba de la oxidasa detecta la presencia del citocromo c oxidasa, y se lleva a cabo frotando unas colonias en un papel de filtro mojado con el reactivo comercial (1% solución acuosa de tetrametil-para-fenilenediamina dihidroclorido) y esperando un máximo de 30 segundos. La prueba es positiva cuando se crea color morado.

En el caso de muestras genitales, la observación de diplococos Gram negativos y oxidasa positivos, junto al crecimiento de colonias con la morfología típica de los gonococos en medios selectivos, sirve como una identificación fiable de *N. gonorrhoeae* (17). Este diagnóstico presuntivo es suficiente para iniciar el tratamiento, especialmente con pacientes en alto riesgo y cuando los recursos son limitados. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de gonorrea requiere la eliminación de especies similares como *N. meningitidis*, *Neisseria lactamica* y *N. cinerea*, ya que estas especies pueden crecer en los medios selectivos mencionados anteriormente. Además, la probabilidad de aislar dichas especies en muestras extragenitales es alta, por lo que son necesarias un mayor número de pruebas para confirmar la identidad de los gonococos.

1.7.4.1. Control de calidad de los reactivos para la prueba de la oxidasa

El control de calidad se debe realizar en intervalos regulares y cada vez que se utilice un nuevo lote de reactivos. Se debe realizar el control sobre cepas de referencia oxidasa positivas, como *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, y oxidasa negativas, como *S. epidermidis* ATCC 12228 y *E. coli* ATCC 25922.

1.7.5. Confirmación de la identificación de *N. gonorrhoeae* después del cultivo

Tras la identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae*, se pueden realizar 4 tipos de pruebas para confirmar la identidad de los gonococos. Dichas pruebas son las siguientes:

- Pruebas bioquímicas.
- Pruebas inmunológicas.
- Nuevas técnicas de espectrometría de masas, como el MALDI-TOF.
- Pruebas moleculares.

La elección de la técnica dependerá del número de aislados que se vayan a analizar y los costes, entre otros.

1.7.5.1. Pruebas bioquímicas

El método tradicional se basa en la habilidad de *N. gonorrhoeae* para producir ácido mediante la oxidación de glucosa, lo que reduce el pH y causaría un cambio de color de un indicador de pH. Esta propiedad se detecta inoculando cultivos puros en agar cisteína tripticasa (ACT), el cual contiene glucosa, maltosa y sacarosa, e incubando durante 24 horas. También es efectivo el test rápido de utilización de carbohidratos (TRUC) (245,246), basado en la producción de enzimas en vez de en el crecimiento, y cuyos resultados se logran a las 4 horas.

Algunas pruebas comerciales se basan en la detección de varios enzimas producidos por los gonococos. Los principales son Gonocheck-II (E-Y Laboratories) (246,247) y “*Neisseria* Preformed Enzyme Test” (PET, Key Scientific). Estas técnicas no requieren incubaciones, logrando los resultados rápidamente. Ambas pruebas se basan en la presencia o ausencia de algunos enzimas, lo que causa cambios de color en la muestra. Sin embargo, estas pruebas pueden dar falsos positivos, pues algunas especies saprófitas de *Neisseria* producen algunos de los enzimas utilizados en las pruebas. También se pueden dar falsos negativos si los aislados no expresan los enzimas requeridos.

Hoy en día existen pruebas comerciales que combinan pruebas de utilización de carbohidratos y pruebas de detección de enzimas, logrando así mejores resultados que por separado. Dos ejemplos son API NH (bioMérieux) y RapID NH (Remel) (247). Ambos contienen sustratos deshidratados en una serie de pocillos, los cuales se llenan con una suspensión de colonias. Tras 2-4 horas de incubación a 37°C se observarán los cambios de colores producidos, y se consigue un perfil numérico. La identificación se

realiza comparando el perfil obtenido en una base de datos, ya sea en papel u online en la página web del proveedor.

1.7.5.1.1. Control de calidad de pruebas bioquímicas

Se debe realizar un control de calidad con cada nuevo lote, utilizando una cepa de referencia de *N. gonorrhoeae*. También se pueden utilizar otras especies como *N. meningitidis* ATCC BAA-355, *N. lactamica* ATCC 23970, *N. sicca* ATCC 9913 y *N. cinérea* ATCC 14685.

1.7.5.2. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

El “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight” (MALDI-TOF) es una combinación de una técnica de ionización suave (MALDI) seguido de un detector de iones (TOF). Las principales ventajas de esta técnica son las siguientes (248):

- Se requiere una cantidad pequeña de muestra.
- Rápida y sencilla de realizar.
- Alta especificidad para la diferenciación de especies.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es el alto coste del equipo, aunque el coste de su uso es muy bajo. Por último, distingue de forma efectiva las especies comensales de *Neisseria* de las especies patógenas, además de distinguir entre *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

1.7.5.3. Pruebas inmunológicas

Aunque tienen un alto coste económico, las pruebas inmunológicas son especialmente útiles en laboratorios con un alto número de aislados. No requieren el uso de cultivos puros, así que se puede realizar la identificación 24 horas antes que con las pruebas bioquímicas.

Hoy en día existe una variedad de pruebas comerciales. Uno de ellos es el “Phadebact Monoclonal GC test” (Boule) (246,247), que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos para la porina PorB de la membrana exterior. Los anticuerpos son absorbidos por la proteína A de *Staphylococcus aureus* y, al mezclarse con el antígeno del gonococo, se produce la aglutinación. Esta técnica permite la identificación de *N. gonorrhoeae*, además de clasificarlo en el serogrupo WI (IA; PorB1a) o WII/III (IB; PorB1b). La prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad. Otras pruebas comerciales utilizan sets de anticuerpos similares, pero el método de detección varía.

1.7.5.3.1. Control de calidad de las pruebas inmunológicas

Se debería realizar un control de calidad por cada nuevo lote de reactivos. Como control positivo se deben utilizar *N. gonorrhoeae* serogrupo WI (cepa de referencia G de la OMS) (196) y WII/III (cepa de referencia K de la OMS) (196). Como control negativo se debe utilizar una especie altamente relacionada a *N. gonorrhoeae*, como *N. lactamica* ATCC 23970.

1.7.6. Diagnóstico molecular

1.7.6.1. Introducción de las técnicas moleculares

Hoy en día la detección de la infección gonocócica se realiza mayormente mediante pruebas comerciales de TAAN, los cuales amplifican una región específica del ADN o ARNr de *N. gonorrhoeae* y luego detectan las copias generadas. Las regiones detectadas (ARNr 16S, genes Opa, etc.) y el método de amplificación (PCR convencional, PCR a tiempo real, etc.) pueden diferir dependiendo de la prueba comercial empleado. Las TAAN son altamente sensibles y específicas, aunque la especificidad puede variar entre diferentes TAAN (17). El proceso de las TAAN dura cerca de un día laboral, por lo que son más rápidas que los cultivos, los cuales duran entre 2 y 3 días. Las TAAN tienen una mayor sensibilidad que los cultivos y una mayor tolerancia a los problemas que puedan suceder durante la colección, transporte y almacenamiento de las muestras (17). Las desventajas de las TAAN incluyen el costo del equipo y reactivos, la incapacidad para realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana y la especificidad subóptima de algunas TAAN. A pesar de estas desventajas, se debe promover el uso de TAAN junto con cultivos incluso en laboratorios de bajos recursos.

1.7.6.2. Tipos de muestras para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae*

Se pueden utilizar muchos tipos de muestras, incluidas las invasivas y no invasivas. Sin embargo, las diferentes TAAN pueden estar dirigidas a distintos tipos de muestras, por lo que se debe consultar las instrucciones proporcionadas por las casas comerciales para conocer el tipo de muestra ideal en cada caso.

No existen aún TAAN con licencia para analizar muestras extragenitales, pero hay pruebas de que las TAAN son más sensibles que los cultivos para ese tipo de muestras (249–251). Aun así, los resultados positivos deberían ser confirmados con una prueba suplementaria (TAAN con otra secuencia diana) para evitar los resultados falsos positivos (252,253). Se debe tener especial cuidado con las muestras faríngeas porque las

TAAN pueden mostrar reactividad cruzada con las especies comensales del género *Neisseria* o con *N. meningitidis*.

1.7.6.3. Efecto del valor predictivo positivo

La sensibilidad y especificidad de las TAAN junto con la prevalencia de la gonorrea en la población son factores a tener en cuenta ya que pueden afectar al valor predictivo positivo (VPP) de la prueba, y por lo tanto, al número de falsos positivos obtenidos. Una baja prevalencia reduce el VPP incluso al emplear TAAN altamente sensibles y específicas (17). El VPP mínimo requerido es de >90%, de modo que, cuando el VPP tenga un valor menor se debe realizar una TAAN suplementaria (con una secuencia diana diferente) para confirmar los resultados (17). Esto es particularmente importante para las TAAN que identifican *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* porque la prevalencia de estas dos infecciones pueden variar sustancialmente. En muchos países la prevalencia de *C. trachomatis* es considerablemente superior a la de *N. gonorrhoeae*, por lo que el primer microorganismos podría no necesitar una prueba suplementaria, pero la segunda podría necesitarla (17).

1.7.6.4. Control de calidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

Se debe incluir un control de calidad interno en cada prueba que se realice. También se deben realizar una evaluación interna de calidad de forma regular repitiendo pruebas en muestras cuyo resultado es desconocido. El número y frecuencia de estas evaluaciones depende del número de pruebas realizados, entre el 1 y 5% del total testado al mes por ejemplo. También se deben realizar evaluaciones de calidad externas, que se pueden realizar utilizando paneles de muestras proporcionadas por proveedores como el “United Kingdom National External Quality Assessment Services” (UK NEQAS; www.ukneqas.org.uk) y “Quality Control of Molecular Diagnostics” (QCMD; www.qcmd.org), lo cuales suministran paneles a varios países. Otra opción para las evaluaciones externas es el intercambio de muestras entre distintos laboratorios, aunque es un proceso más informal.

1.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

1.8.1. Introducción

N. gonorrhoeae ha desarrollado resistencia a todos los antibióticos previamente utilizados como tratamiento de primera línea, como penicilinas, tetraciclina y fluoroquinolonas. En los últimos años los únicos antimicrobianos recomendados en muchos países han sido cefixima y ceftriaxona y azitromicina (115), pero hoy en día se

han reportado casos de tratamientos de cefixima fallidos, e incluso casos esporádicos de tratamientos fallidos a ceftriaxona (172). Si las cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a ceftriaxona se propagasen por el mundo, la gonorrea podría volverse intratable a la monoterapia en ciertas circunstancias (115).

Debido a estas razones, es esencial la monitorización a nivel local, regional y global de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*. Para ello se utiliza una serie de pruebas de sensibilidad antimicrobianas, las cuales se dividen en pruebas de determinación de la CMI y las pruebas de determinación cualitativa. La CMI de un agente antimicrobiano para un aislado es aquella concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento del aislado. Los métodos que determinan la CMI son la dilución en agar y E-test, mientras que la difusión en agar disco-placa realiza la determinación cualitativa.

Todas las pruebas de sensibilidad antimicrobiana deben realizarse a partir de cultivos de *N. gonorrhoeae* puros y recientes (18-24 horas de incubación). Además, se debe confirmar previamente la identidad de los gonococos.

1.8.2. Medio de agar recomendado

El medio recomendado para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* es el agar GC, como el “Difco GC Medium Base”, suplementado con 1% de medio de crecimiento definido o 1% IsovitaleX/Vitox.

1.8.3. Criterios de interpretación

Los criterios de interpretación que clasifican los aislados en sensible, sensibilidad intermedia o resistente son establecidos por organizaciones como CLSI (254) y EUCAST (255), entre otras. Los puntos de corte establecidos por ambas organizaciones para *N. gonorrhoeae* son similares en la mayoría de casos, aunque EUCAST establece puntos de corte menores para cefixima y ceftriaxona, y CLSI no ha establecido puntos de corte para la interpretación de azitromicina mediante CMI.

1.8.4. Control de calidad de la determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Cada vez que se realice una serie de pruebas se debe incluir una cepa de referencia de la OMS (196) o de CLSI (254), o cada vez que se estrene un nuevo lote de medio de cultivo o un nuevo lote de tiras de E-test. Al observar los resultados, las CMI de la cepa control deben situarse entre los rangos establecidos para dicha cepa. En el caso de la difusión en agar disco-placa, el diámetro del halo de inhibición producido en la cepa de control debe situarse dentro del rango establecido para dicha cepa.

1.8.5. Elección de antibióticos

Los antibióticos testados en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana deberían ser aquellos recomendados para el tratamiento de la infección gonocócica y los recomendados por los programas de vigilancia. También pueden testarse antibióticos que podrían suponer una opción de tratamiento en el futuro o predecir la resistencia a otros antibióticos con el mismo mecanismo de acción.

1.8.6. Dilución en agar

La dilución en agar es la técnica de referencia para determinar la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, aunque es laboriosa y poco apropiada para ser utilizada como prueba de rutina, sobre todo si se analiza un bajo número de aislados.

En esta técnica, se prepara una serie de medios con agar a los que se incorpora el antimicrobiano a evaluar cuando el agar está aún fundido. Se prepara una serie de placas que contienen distintas concentraciones de antimicrobiano, generalmente teniendo cada medio el doble de concentración que el medio anterior, logrando así el rango de dilución deseado. También se preparan dos placas sin antimicrobiano que sirven como control positivo. Una vez solidificados los medios, son inoculados empleando un replicador que permite la inoculación de 32-36 aislados a la vez. Una vez inoculados, se incuban las placas durante 18-24 horas y se observan los resultados. La placa con menor concentración de antimicrobiano en la que no se observe crecimiento establece la CMI (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).

1.8.7. E-test

El E-test es una técnica de difusión en agar que determina la CMI de un antimicrobiano contra un microorganismo. En esta técnica se utiliza una tira de plástico que contiene un gradiente de antimicrobiano, en mg/L. Una vez depositada la tira en la superficie de un medio de cultivo inoculado, el antimicrobiano se difunde por el medio y tras 18-24 horas de incubación produce una zona elíptica de inhibición de crecimiento. La intersección de la elipse con la escala de gradiente marcada en la tira muestra la CMI. Si la intersección se encuentra entre dos valores de la tira, la CMI corresponde al mayor valor.

1.8.8. Difusión en agar disco-placa

La difusión en agar disco-placa es una técnica cualitativa que se basa en el diámetro de los halos de inhibición observados, a diferencia de la técnica de E-test y la dilución en agar, las cuales determinan la CMI. Se utilizan discos comerciales

impregnados con una concentración conocida de antimicrobiano. Una vez depositados los discos en un medio previamente inoculado, los antimicrobianos se difunden por la superficie del medio creando un gradiente de antimicrobiano, con las mayores concentraciones cerca del disco, y menores a medida que se alejan. Tras una incubación de 18-24 horas se observa un halo de inhibición cuyo diámetro se mide (en mm) y proporciona la categoría de sensibilidad.

Hoy en día se utilizan diferentes métodos de difusión en agar disco-placa, los cuales se diferencian en la potencia (concentración de antimicrobiano) de los discos y el agar utilizado. Estas diferencias resultan en diferentes puntos de corte a la hora de categorizar los aislados. Los más utilizados son el método de difusión en disco de CLSI (244) y el método de la Sociedad Británica para quimioterapia antimicrobiana (“British Society for Antimicrobial Chemotherapy”, BSAC) (256). Otro método es la difusión en disco de sensibilidad dicotómica calibrada (“calibrated dichotomous sensitivity”, CDS), muy utilizado en las regiones Pacífico Oeste y Sureste Asiático de la OMS (257), el cual se diferencia de los dos anteriores.

La difusión en agar disco-placa es barata, pero solo se recomienda su uso cuando no se puede realizar la determinación de la CMI debido a limitaciones de recursos u otras razones (17).

1.8.9. Interpretación de los resultados

Independientemente del método de sensibilidad antimicrobiana que se haya utilizado, el CLSI clasifica los aislados en los siguientes grupos (254): sensible (S), sensible dependiente de dosis (SDD), intermedio (I), resistente (R) y no sensible (NS).

- Sensible (S): Los aislados de esta categoría son inhibidos cuando se utiliza la dosis recomendada de antimicrobiano, lo que se traduce en un probable éxito clínico.
- Sensible dependiente de dosis (SDD): Para inhibir los aislados de esta categoría es necesaria una mayor exposición antimicrobiana de lo recomendado, es decir, dosis de mayor concentración de antimicrobiano y/o mayor frecuencia de dosis. El concepto SDD es muy reciente, y por el momento se incluye dentro de la categoría I.
- Intermedio (I): Para inhibir los aislados de esta categoría es necesaria una concentración de antimicrobiano que se encuentra al límite de lo alcanzable en sangre y tejidos. Se puede lograr un éxito clínico en zonas del cuerpo donde los antimicrobianos están fisiológicamente concentrados (quinolonas y β -lactámicos en orina, *etc.*) o cuando se puede utilizar una dosis mayor de lo recomendado (β -lactámicos, *etc.*).

- Resistente (R): Los aislados de esta categoría no se inhiben con las dosis de antimicrobiano recomendadas y suelen mostrar mecanismos de resistencia específicos, como β -lactamasas. Además, los estudios de tratamiento no han mostrado una eficacia clínica del antimicrobiano los aislados.
- No sensible (NS): Esta categoría se utiliza en los casos que solo se han establecido los criterios de interpretación de la categoría S, es decir, que no hay criterios establecidos para las otras categorías (SDD, I o R), debido a la ausencia o extrema rareza de aislados resistentes. Los aislados cuyas CMI están por encima del punto de corte S, o cuyos diámetros de halos están por debajo, deben reportarse como NS.

A pesar de haber establecido estas 5 categorías, el CLSI solo utiliza las categorías S, SI y R para la interpretación de los resultados de sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*.

1.8.10. Detección de resistencia a penicilina mediada por plásmidos

N. gonorrhoeae puede transportar un plásmido que produce un enzima (β -lactamasa) que inactiva las algunas penicilinas como ampicilina, penicilina, amoxicilina y bencilpenicilina. El método más extendido es el de la cefalosporina cromogénica, la cual es simple, sensible y específica. Cuando el anillo β -lactámico de la cefalosporina cromogénica, nitrocefina, es hidrolizada por la β -lactamasa, se produce un cambio de color de amarillo a rojo. Este método está disponible comercialmente en varios formatos (258). Otro método menos estandarizados y de menor calidad son el método acidométrico y método iodométrico.

1.8.10.1. Método de disco de nitrocefina

Se hidrata un disco de nitrocefina en un portaobjetos con agua destilada estéril. Con un asa estéril se toman varias colonias de un cultivo puro de gonococo que ha estado incubando toda la noche. Una reacción positiva normalmente produce color rojo en un minuto. Puede haber reacciones positivas débiles que tarden más tiempo en desarrollar el color. Si no se observa color, es decir, se mantiene amarillo, se considera como resultado negativo.

1.8.10.2. Método de dilución de nitrocefina

Se realiza bien añadiendo unas gotas de reactivo directamente sobre el crecimiento en el medio de cultivo o por inoculación de la solución sobre un portaobjetos o sobre papel de filtro con colonias. Para ello se puede utilizar tanto solución de nitrocefina comercial como de preparación casera usando polvo de nitrocefina. Al igual

que en el método de nitrocefina en disco, un cambio de color a rojo en cerca de un minuto indica un resultado positivo, y si se mantiene el color amarillo se considera negativo.

1.8.10.3. Método acidométrico

Se coloca una tira de papel de filtro en una placa de Petri limpia y se satura el papel con solución de penicilina (0,05 mol/l de tampón fosfato, pH 8,0, 0,2 g/l de púrpura de bromocresol, y 50 g/l de bencilpenicilina sin tampón). Con un asa estéril se extienden 10-20 colonias sobre un área de 5 mm del papel de filtro. Se incuba el papel de filtro inoculado a temperatura ambiente durante 30 min con la tapa puesta. Un cambio de color de azul a amarillo en un tiempo cercano a 10 minutos indica un resultado positivo.

1.8.10.4. Método iodométrico

Se prepara una mezcla de penicilina-yodo añadiendo 1,1 ml de una solución de yodo (1,5 mg de yoduro de potasio y 0,3 g de yodo en 100 ml de 0,1 mol/l de tampón fosfato, a pH 6,4, almacenado en una botella marrón a 4 °C) a un vial que contiene 0,15 ml de solución de bencilpenicilina (1.000.000 UI/ml, almacenadas a -20 °C). La mezcla de reactivos se debe utilizar en la hora siguiente a su preparación. Con un asa estéril se cogen varias colonias de la placa de crecimiento del microorganismo y se emulsionan con una gota de la mezcla penicilina-yodo en un portaobjetos. Se añade una gota de solución de almidón (4 g/l en agua destilada, autoclavada y almacenada a 4 °C) dando un color purpura intenso a la mezcla. Si el color permanece durante 5 minutos indica que se trata de un resultado negativo. Si se produce un cambio a incoloro en 5 minutos indica un resultado positivo.

1.9. Tipado de *N. gonorrhoeae*

El tipado de *N. gonorrhoeae* se puede utilizar para clasificar las poblaciones de esta especie en subpoblaciones llamadas cepas. Este proceso ha sido utilizado durante muchos años en los estudios epidemiológicos con diferentes objetivos:

- Identificar cepas específicas que se propagan en poblaciones humanas específicas.
- Identificar variaciones temporales y geográficas entre las cepas.
- Identificar los patrones de proliferación y transmisión de cepas individuales, particularmente las resistentes a antibióticos.
- Confirmar o descartar los fracasos de tratamientos.
- Confirmar o descartar la conexión epidemiológica entre distintos aislados.

Dado que el tipado de los aislados de *N. gonorrhoeae* puede tener distintos objetivos, es muy importante que se utilice la técnica de tipado más efectiva para cumplir los objetivos propuestos. Sin embargo, cualquier técnica de tipado empleada debería ser lo bastante discriminativa para diferenciar aislados de distinto origen epidemiológico, y lo bastante estable para identificar casos que tengan un mismo origen epidemiológico (216). Las técnicas de tipado que han sido utilizadas para el tipado de *N. gonorrhoeae* se clasifican en las no basadas en el ADN y las basadas en el ADN. Todas las técnicas utilizadas hoy en día están basadas en el ADN, pues tienen un mayor poder de discriminación y reproducibilidad.

1.9.1. Técnicas de tipado no basadas en el ADN

Durante varias décadas, la diferenciación de cepas de *N. gonorrhoeae* se ha realizado mediante métodos fenotípicos como la determinación del perfil de sensibilidad antimicrobiana, auxotipado y determinación de serovares (216).

1.9.1.1. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son efectivas para elegir un tratamiento adecuado para los pacientes, monitorizar los cambios en los patrones de sensibilidad antimicrobiana e identificar la proliferación de fenotipos resistentes. Sin embargo, los perfiles de sensibilidad antimicrobiana tienen un poder de discriminación bajo y no son utilizados hoy en día para la caracterización de cepas.

1.9.1.2. Auxotipado

El auxotipado clasifica las cepas dependiendo de los requerimientos nutricionales de aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Su poder de discriminación es bajo y no se utiliza hoy en día.

1.9.1.3. Serotipado

El serotipado clasifica los aislados dependiendo de la heterogeneidad antigénica de la proteína porina (PorB) de la membrana exterior de *N. gonorrhoeae*. Se ha utilizado mucho en el pasado e incluso sigue siendo utilizado hoy en día como técnica de control para evaluar nuevas técnicas de genotipado (216). Tiene un mayor poder de discriminación que el auxotipado, pero menor que las técnicas actuales de genotipado. Otras desventajas incluyen la cada vez mayor prevalencia de cepas no serotipables y la aparición continua de nuevos serovares debido a la evolución del gen *porB* (216). Sin embargo, esta técnica es útil en regiones que carezcan de técnicas basadas en el ADN.

Durante las décadas de 1980 y 1990 muchos laboratorios utilizaron la combinación de auxotipado y serotipado para la caracterización de las cepas gonocócicas. La combinación de estos dos métodos ofrece un alto poder de discriminación, aunque menor que las técnicas modernas de genotipado (216).

1.9.2. Técnicas de tipado basadas en el ADN

Durante las dos últimas décadas se han desarrollado técnicas de genotipado que se basan en la caracterización de plásmidos y/o la determinación de polimorfismos en un locus o en múltiples loci. Las técnicas de tipado basadas en el ADN pueden dividirse en las técnicas de gel, que se basan en el análisis de patrones de bandas de ADN logradas mediante electroforesis, y las técnicas de secuenciotipado, basadas en el análisis de secuencias de ADN.

1.9.2.1. Técnicas de tipado de gel

1.9.2.1.1. Análisis del contenido plasmídico

Esta técnica consiste en la caracterización de una parte específica o de todo el contenido plasmídico. Los plásmidos analizados son aquellos que contienen determinantes de resistencia y los productores de β -lactamasas (216). El poder discriminatorio y la reproducibilidad de la técnica son bajos porque los aislados pueden adquirir o perder plásmidos, de modo que no es recomendable como técnica de rutina.

1.9.2.1.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis en campo de gel pulsado (PFGE)

Estas técnicas consisten en la digestión del genoma bacteriano mediante endonucleasas de cortes infrecuentes, logrando fragmentos largos de ADN, y la posterior separación de los fragmentos en un gel sujeto a electroforesis de campo pulsado (259). Al lograr fragmentos de ADN de gran tamaño, se observan pocas bandas en el gel, lo que facilita la lectura de los resultados. Esta técnica es muy útil para discriminar aislados en casos de extrema microepidemiología (216), pero tiene algunas desventajas como la dificultad del proceso y de la interpretación de los patrones de bandas, además de requerir mucho tiempo y tener un coste alto.

1.9.2.1.3. Ribotipado

El ribotipado consiste en la digestión del ADN mediante enzimas de restricción y la posterior identificación de genes ribosomales mediante hibridación. Se logran patrones de hibridación muy específicos y reproducibles, y la interpretación es

relativamente simple. Algunas desventajas son el bajo poder discriminatorio y el alto tiempo requerido para realizar la técnica (216).

1.9.2.1.4. Tipado Opa

El tipado Opa consiste en la amplificación de 11 genes opa seguido de la digestión mediante endonucleasas de restricción con los enzimas TaqI y HhaI y separación mediante electroforesis en gel (260). Finalmente se interpretan los patrones de bandas logrados en el gel. Es una técnica altamente discriminatoria y reproducible, pero es laborioso y la interpretación de los resultados es subjetiva. Además de la caracterización de aislados de *N. gonorrhoeae*, también ha sido utilizado para el seguimiento de cepas entre contactos sexuales (261,262), resolver casos de sospecha de reinfección (263) y para la justificación de tratamientos fallidos (263,264). Ha sido utilizado para aumentar el poder discriminatorio de otras técnicas de tipado, sobre todo en análisis de microepidemiología extrema (216).

1.9.2.2. Técnicas de secuenciotipado

1.9.2.2.1. Secuenciación completa del gen *porB*

Esta técnica consiste en el análisis de la secuencia del gen *porB* completo cercana a 1.000 pares de bases (pb). Es altamente discriminatorio y reproducible, y todas las cepas son tipables mediante esta técnica (216). Además de la caracterización de aislados de *N. gonorrhoeae*, también ha sido utilizado para el seguimiento de cepas entre contactos sexuales (265,266), investigación de tratamientos fallidos (265) y genética de poblaciones (267). Sin embargo, no existe una base de datos que contenga secuencias completas del gen *porB*, lo que dificulta la comparación de las secuencias completas, aunque existe una base de datos que contiene un fragmento de 490 pb del gen *porB*. Una variante de esta técnica es el tipado por pirosecuenciación, que consiste en una PCR a tiempo real de fragmentos altamente polimórficos del gen *porB*, seguido de un análisis por pirosecuenciación. Otra variante es el tipado por sondas biotiniladas, que consiste en la hibridación de sondas biotiniladas a regiones variables del gen *porB*. Sin embargo, estas dos variantes no son muy utilizadas por los costes del equipo de pirosecuenciación y algunas desventajas de las técnicas de hibridación: bajo poder de discriminación, reproducibilidad limitada, etc.

1.9.2.2.2. *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing

El método “*Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing” (NG-MAST) analiza dos fragmentos internos variables de dos loci altamente polimórficos de *N. gonorrhoeae*: *porB* (se analizan 490 pb) y *tbpB* (se analizan 390 pb), el cual codifica

la subunidad B de la proteína de unión a transferrina (268). Es una técnica de alto poder de discriminación y reproducibilidad. Es sencilla y se cuenta con una base de datos pública que asigna los ST correspondientes a las secuencias. Además, los aislados con ST idénticos pueden ser diferenciados mediante técnicas adicionales como la secuenciación completa de *porB* o el tipado Opa. Además de la caracterización de aislados de *N. gonorrhoeae*, también ha sido utilizado para el seguimiento de cepas entre contactos sexuales (262,266), investigación de tratamientos fallidos (265) y predicción de resistencia antimicrobiana (269), aunque se debe profundizar en el estudio de si ciertos ST están realmente relacionados con la resistencia a determinados antimicrobianos. Entre los inconvenientes, normalmente requiere el uso de cultivos de *N. gonorrhoeae* puros y se debe optimizar el método para su uso con muestras de todo tipo (270).

Las cepas gonocócicas con ST diferentes pero altamente similares pueden ser agrupadas en un mismo genogrupo, lo que permite un análisis estadístico de mayor confianza al analizar la relación entre los ST y otros datos epidemiológicos como la resistencia antimicrobiana o las características sociodemográficas de los pacientes de infección gonocócica. No existe un criterio internacional establecido para la definición de los genogrupos, pero la definición más aceptada consiste en que dos ST diferentes forman parte de un mismo genogrupo si (271):

- comparten un mismo alelo, ya sea el de *porB* o *tbpB*.
- para la secuencia restante tienen diferentes alelos, pero entre estos alelos existe una similitud de al menos un 99% (≤ 5 pb de diferencia para *porB* y ≤ 4 pb de diferencia para *tbpB*).

1.9.2.2.3. Multilocus sequence typing

El “multilocus sequence typing” (MLST) analiza los fragmentos internos de los alelos de siete o más genes constitutivos (“housekeeping”) cromosomales. Estos genes están relativamente conservados y deben estar distribuidos a lo largo del genoma para lograr un análisis óptimo. Cada secuencia lograda con esta técnica recibe un número de alelo, y combinando los siete números se crea un perfil alélico, obteniendo así un ST. Además, el análisis de perfiles alélicos permite la construcción de dendogramas que muestran la relación genética de los aislados (272).

Existe una base de datos (<http://www.mlst.net>) en los que se pueden caracterizar los aislados. Se han descrito 18 genes constitutivos aptos para el análisis por MLST (273), aunque los genes *abcZ*, *adK*, *fumC*, *gdh*, *glnA*, *gnd* y *pyrD* parecen dar los mejores resultados (274). Uno de sus inconvenientes es su coste material y la necesidad de conocimientos bioinformáticos.

1.9.2.2.4. Número variable de repeticiones en tándem (VNTR) y análisis VNTR de multilocus

El análisis VNTR de multilocus (MLVA) analiza la variación en el número de repeticiones en tándem en diferentes loci distribuidos por el genoma. Es rápido y de manejo sencillo, tiene un alto poder discriminatorio y ha sido utilizado para la caracterización de varias bacterias patógenas como *N. meningitidis* (275).

1.10. Interés del estudio

La infección gonocócica representa 106 millones de los aproximadamente 498 millones de casos nuevos de ITS curables que se producen en el mundo cada año (11). Además, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a todos los antimicrobianos previamente empleados en el tratamiento de la gonorrea. La aparición en los últimos años de cepas gonocócicas con sensibilidad disminuida y/o resistencia a CES, concretamente a ceftriaxona, la cual supone la última línea de tratamiento hoy en día, supone un gran motivo de preocupación. La gonorrea tiene el potencial de convertirse en una infección intratable en el futuro debido a las limitadas opciones en el tratamiento, sobre todo en entornos subdesarrollados donde también tienen una elevada carga de infección gonocócica.

Esta pérdida de opciones de tratamiento eficaces y fáciles de conseguir dará lugar a un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad, ya que en un futuro podríamos estar en una situación similar a la era pre-antimicrobiana cuando una simple infección podía tener riesgo de muerte. Por esta razón nos planteamos el reto de realizar un estudio de vigilancia epidemiológica de la infección gonocócica en nuestra área sanitaria que nos aporte un conocimiento detallado de la incidencia de aislados, de la población de riesgo de sufrir esta infección, la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas, así como la caracterización de estas cepas con el objetivo de prevenir la aparición de cepas resistentes a todos los antibióticos actualmente disponibles.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos principales

1. Estimar la incidencia de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* identificados en el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto (Bilbao) durante los años 2014 y 2015.
2. Determinar los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana de estos aislamientos a distintos antimicrobianos recomendados para su tratamiento o que pueden suponer una opción terapéutica en el futuro, por el método de dilución en agar y/o por el método de difusión en agar disco-placa y/o por el método E-test.
3. Realizar la caracterización molecular de las cepas aisladas.

2.2. Objetivos secundarios

1. Establecer la correlación entre los resultados obtenidos por los distintos métodos de sensibilidad antimicrobiana utilizados.
2. Analizar la relación de los distintos ST y genogrupos obtenidos con las características de los pacientes y la resistencia antimicrobiana.
3. Evaluar los resultados obtenidos a lo largo del estudio y compararlos con los datos obtenidos por otros estudios similares realizados en nuestro servicio, a nivel nacional y en otros países.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio epidemiológico descriptivo prospectivo en el que se analizan los aislamientos de *N. gonorrhoeae* realizados en el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto de Bilbao durante el período comprendido entre los años 2014 y 2015, además de los datos demográficos de los pacientes a los que pertenecen estos aislamientos.

3.2. Selección de las cepas

Las cepas estudiadas fueron aisladas en el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto de Bilbao durante los años 2014 y 2015. Este hospital da cobertura a la Comarca Sanitaria de Bilbao, con una población de 346.574 habitantes en el año 2014 y 354.141 habitantes en el año 2015, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística. El Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección ofrece servicio al Hospital Universitario Basurto así como a los 25 ambulatorios que forman parte de la Comarca Sanitaria de Bilbao.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en el Servicio de Microbiología y Control de Infección son archivadas y conservadas a -80°C en crioviales Viabank (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido). La colección de cepas incluidas en este estudio fue aislada desde enero del año 2014 a diciembre del año 2015.

3.3. Características sociodemográficas y datos clínicos de los pacientes

La población incluida en este estudio es aquella a la que pertenecen las cepas seleccionadas, es decir, aquellos pacientes en los que se sospecha una posible infección gonocócica bien porque siguen un control de ITS, por que han tenido una relación sexual de riesgo, es decir, sin protección o porque clínicamente han sido diagnosticados de infección gonocócica y cuya infección ha sido confirmada mediante métodos diagnósticos microbiológicos en el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto desde enero de 2014 a diciembre de 2015. Estos pacientes fueron atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Basurto, en las consultas externas del mismo o en ambulatorios o centros de salud pertenecientes a la Comarca Sanitaria Bilbao.

La unidad de análisis a la hora de estudiar las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes fue el episodio en el que se diagnosticó la infección gonocócica. Se considera un nuevo episodio cuando, tras una primera infección gonocócica y transcurridos al menos tres meses tras la administración del tratamiento antimicrobiano

indicado, han desaparecido los signos y síntomas de la infección junto con la erradicación del microorganismo con confirmación microbiológica, volviendo a ser infectado con otra cepa gonocócica distinta a la anterior. Solo se consideró una cepa de *N. gonorrhoeae* por paciente dentro del mismo episodio, aunque en los casos donde la infección se detectó en distintas localizaciones anatómicas se ha tenido en cuenta una cepa de cada localización.

Por otro lado, se considera reinfección cuando un paciente que, tras una primera infección gonocócica y habiendo recibido tratamiento efectivo con la consiguiente mejoría o desaparición de signos o síntomas de infección gonocócica, junto con la erradicación del microorganismo confirmado microbiológicamente, vuelve a ser infectado por una pareja sexual infectada no tratada.

3.4. Procesamiento de las muestras

Las muestras seleccionadas para este estudio fueron obtenidas de los pacientes con sospecha o diagnóstico clínico de infección gonocócica. El clínico que atiende a los pacientes en el momento del episodio es el encargado de enviar las muestras al Laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto para llevar a cabo su procesamiento.

3.4.1. Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram a las muestras uretrales, endocervicales y vaginales. Los pasos llevados a cabo para realizar la tinción de Gram fueron los siguientes:

- Se cubre el frotis fijado con cristal violeta durante 30 segundos y se lava suavemente con agua fría.
- Se inunda el portaobjetos con una solución de yodo durante 30 segundos y se lava suavemente con agua fría.
- Se decolora la preparación con una mezcla acetona-etanol durante unos segundos hasta que el color purpura desaparece y se lava rápidamente con agua corriente para detener la decoloración.
- Se realiza una contratinción con safranina o fucsina fenicada durante 1 minuto.
- Se lava con agua corriente y se deja secar a temperatura ambiente.
- Se observa el frotis en un microscopio óptico con aceite de inmersión y un objetivo de 1000 aumentos.

Se registró lo observado en el frotis: células epiteliales, LPMN, morfología de las bacterias, y localización intracelular o extracelular de las mismas. Se examina el frotis

durante al menos 2 minutos antes de concluir que no contiene ningún diplococo Gram negativo.

3.4.2. Inoculación e incubación del cultivo

Las muestras fueron inoculadas e incubadas de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se rota una torunda que contiene la muestra sobre aproximadamente un cuarto de la superficie del medio de cultivo.
- Se extiende el inóculo sobre el resto del medio para lograr el crecimiento de colonias aisladas.
- Se incuban los medios en una estufa.

Los medios de cultivos empleados para la inoculación de las muestras fueron el medio de agar GC-Lect™ y agar Chocolate (Becton Dickinson). La incubación se realizó en una estufa a 35°C, en una atmosfera de un 70% de humedad y suplementados con 5% de CO₂ mediante una bomba inyectora de CO₂. Las placas se examinaron tras 18-24 horas de incubación, y en caso de observar colonias sospechosas de *N. gonorrhoeae*, se les realizó la identificación, además de los estudios de sensibilidad antimicrobiana y caracterización molecular. Aquellos cultivos en las que no se observó crecimiento de colonias sospechosas fueron incubados 24 horas más, hasta un total de 48 horas. En caso de no observar colonias sospechosas a las 48 horas, se desecharon las muestras.

La información referente a las muestras recibidas en el laboratorio se obtuvo a través de la base de datos del sistema informático del laboratorio, donde se registran los datos reflejados en los volantes de las muestras. Los datos referentes a las muestras registrados fueron:

- Tipo de muestra y localización.
- Fecha de toma de la muestra.
- Servicio de procedencia de la muestra.

3.4.1. Identificación de las cepas

Se realizó un identificación presuntiva a las colonias sospechosas de *N. gonorrhoeae*. Para ello se realizó la tinción de Gram, donde se observan diplococos gram negativos, y la prueba de la Citocromo-C-Oxidasa (PathotecR), que es positiva para *N. gonorrhoeae*. Para confirmar la identificación se realizó la batería de pruebas bioquímicas API® NH (bioMerieux). Una vez confirmada la identificación de las cepas de *N. gonorrhoeae*, se procedió al estudio de sensibilidad antimicrobiana por el método

de difusión en agar disco-placa en el medio agar Chocolate. Una vez completada la identificación y el antibiograma, estos aislados fueron almacenados en el cepario del laboratorio. Para ello, se inocularon varias colonias de un cultivo puro de 18-24 horas de incubación en el medio selectivo agar GC Lect™, en viales que contenían aproximadamente 0,5-1 ml de un caldo nutritivo estéril crioprotector con 15-20% de glicerol, con bolas Viabank (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido). Los crioviales fueron almacenados a -80°C disponibles para un posterior uso.

3.4.2. Estudio de sensibilidad antimicrobiana

Se estudió la sensibilidad antimicrobiana de los 360 aislados mediante los métodos de difusión en agar disco-placa, dilución en agar y E-test. Los antibióticos analizados por cada método fueron:

- Difusión en agar disco-placa: penicilina, cefixima, ceftriaxona, cefepima, cefuroxima, ciprofloxacino, espectinomicina, gentamicina, tetraciclina, azitromicina y eritromicina.
- Dilución en agar: cefixima y ceftriaxona.
- E-test: azitromicina.

3.4.2.1. Método de difusión en agar disco-placa

El método de difusión en agar disco-placa consiste en el uso de discos impregnados con una concentración definida de antimicrobiano, los cuales son depositados en un medio de cultivo previamente inoculado. Tras un tiempo de incubación, los discos producen un halo de inhibición que muestra la sensibilidad antimicrobiana del microorganismo en cuestión.

3.4.2.1.1. Elaboración del medio

El método de difusión en agar disco-placa se realizó en el medio agar GC (Becton Dickinson) con 1% de suplemento de crecimiento definido Vitox (OXOID™). El medio se elaboró siguiendo las recomendaciones descritas por CLSI (276):

- Se prepara 1 litro de agar GC desde una base deshidratada disponible comercialmente (Difco GC Medium Base, Becton Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Se autoclava la disolución y se deja enfriar en un baño de agua a 45 °C.
- Se añaden 10 ml de suplemento de crecimiento definido Vitox. Este suplemento contiene los siguientes ingredientes en gramos por litro:

- 0,0 1g vitamina B 12
 - 10 g L-glutamina
 - 1 g adenina
 - 0,03 g clorhidrato de guanina
 - 0,003 g acido p-aminobenzoico
 - 1,1 g L-cistina
 - 100 g glucosa
 - 0,25 g nicotinamida adenina dinucleotido (NAD)
 - 0,1 g tiamina pirofosfato (cocarboxilasa)
 - 0,02 g nitrato ferrico
 - 0,003 g clorhidrato de tiamina
 - 25,9 g clorhidrato de L-cisteina
- Se distribuye el medio en placas Petri estériles de 90 mm de diámetro, añadiendo 20 ml de medio a cada placa, y se deja solidificar. Este último paso debe realizarse en una cabina de flujo laminar.

Una vez solidificadas, las placas fueron almacenaron en un refrigerador a 4°C, donde se almacenaron durante un máximo de cinco días antes de ser utilizadas, según lo recomendado por el CLSI (277).

3.4.2.1.2. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se suspendieron unas colonias de *N. gonorrhoeae* tomadas directamente de un medio de cultivo GC-LECT™ (Becton Dickinson) en una solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 en la escala MacFarland con la ayuda de un nefelómetro. Después se inoculó una torunda estéril en la suspensión y seguidamente se extendió en el medio de Agar GC. Se deslizó la torunda por la superficie del agar en tres direcciones, rotando la placa unos 60 grados cada vez que se cambiaba de dirección, con el objetivo de extender la suspensión por todo el medio.

3.4.2.1.3. Dispensación de los discos antibióticos

Se utilizó un dispensador manual para depositar los discos antibióticos en el medio de Agar GC inoculado. Después, se incubaron en estufa a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad y un 5% de CO₂, durante 18-24 horas. Los antibióticos testados mediante esta técnica y sus correspondientes concentraciones se exponen en la Tabla 3.

3.4.2.1.4. Control de calidad

Como control de calidad se utilizó la cepa de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Esta cepa fue utilizada con cada remesa de placas o cada vez que se trabajaba con un nuevo lote de antimicrobianos.

3.4.2.1.5. Lectura e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los resultados se realizó tras 18-24 horas de incubación de los antibiogramas. La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición de crecimiento del microorganismo producido alrededor de los discos antibióticos. Estos resultados se clasificaron en las categorías de sensible, sensibilidad intermedia o resistente a los antibióticos testados, de acuerdo a los criterios de interpretación publicados por CLSI (254) (Tabla 3). CLSI y EUCAST no establecen puntos de corte para azitromicina y gentamicina, por lo que han sido interpretados de acuerdo a los puntos de corte sugeridos por BSAC (azitromicina) (278) y Bala *et al.* (2016) (gentamicina) (279). En el caso de eritromicina no se han publicado puntos de corte. Los resultados obtenidos fueron dados por válidos siempre que los diámetros de los halos de inhibición de la cepa control (*N. gonorrhoeae* ATCC 49226) realizada en la misma tanda se encontraran dentro de los rangos establecidos por el CLSI (254) (Tabla 3).

3.4.2.2 Método de dilución en agar

El método de dilución en agar se basa en el crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, el cual se encuentra diluido en un medio de cultivo de agar sólido. La inoculación del microorganismo en medios de distintas concentraciones de antimicrobiano revelará la CMI del microorganismo en cuestión.

3.4.2.2.1. Elaboración del medio

El medio empleado fue el agar GC (Becton Dickinson) con 1% de suplemento de crecimiento definido Vitox (OXOIDTM), el cual se elaboró tal y como se describe en el apartado **3.4.2.1.1.**, con la salvedad de que, una vez autoclavado el medio de cultivo y añadido el suplemento de crecimiento, se mezclaron 19 ml de medio de cultivo a 45°C con 1ml de la concentración de antimicrobiano correspondiente para cada placa. Para lograr el rango de dilución deseado se prepararon diez medios con diferente concentración de antibiótico. Como control negativo se prepararon placas de agar GC sin antimicrobiano.

Tabla 3. Antimicrobianos testados en la técnica de difusión en agar disco-placa. Se especifican sus concentraciones, los rangos del control de calidad y los puntos de corte establecidos (254,278,279).

Antimicrobiano	Concentración del disco (mg/L)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 (cepa control)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
			S	I	R
Azitromicina ¹	15	-	≥28	-	≤27
Cefepima	30	37-46	≥31	-	-
Cefixima	5	37-45	≥31	-	-
Ceftriaxona	30	39-51	≥35	-	-
Ciprofloxacino	5	48-58	≥41	28-40	≤27
Cefuroxima	30	28-36	≥31	26-30	≤25
Eritromicina ³	15	-	-	-	-
Espectinomomicina	100	23-29	≥18	15-17	≤14
Gentamicina ²	120	-	≥16	13-15	≤12
Penicilina	10 unidades	47	≥47	27-46	≤26
Tetraciclina	30	30-42	≥38	31-37	≤30

* S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente. ¹Puntos de corte establecidos por BSAC (278). ²Puntos de corte sugeridos por Bala *et al.* (2016) (279). ³No hay puntos de corte establecidos.

3.4.2.2.2. Preparación del antimicrobiano

Se emplearon sustancias valoradas de cefixima y ceftriaxona de potencia conocida, en microgramos (μg) de sustancia pura por miligramo (mg) de sustancia valorada, y se calculó la cantidad de antibiótico en mg necesaria para preparar 1 mililitro (ml) de solución madre siguiendo la fórmula descrita por CLSI (277):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} * \text{Concentración } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{\text{Potencia } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}$$

Figura 2. Fórmula desarrollada para calcular la cantidad (en mg) de sustancia valorada necesaria para conseguir la concentración deseada (277).

La sustancia valorada se pesó en una balanza de precisión. Tal y como indica CLSI (277), para realizar la dilución en agar con cefixima y ceftriaxona se prepararon 10 diluciones seriadas a partir de la solución madre de cada antibiótico, desde 0,5 mg/ml hasta 0,001 mg/ml. Se mezclaron las distintas diluciones con el agar GC fundido y se dejaron solidificar. Las soluciones madre fueron almacenadas en alícuotas a -80°C durante un máximo de 6 meses.

3.4.2.2.3. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo de *N. gonorrhoeae* de 18-24 horas de incubación en medio agar GC-LECT™. Con un asa estéril se seleccionaron 3-4 colonias del cultivo y se suspendieron con 1 ml de solución salina estéril hasta alcanzar una suspensión equivalente a 0,5 en la escala McFarland. Para lograr un mayor rendimiento del cultivo, se incubaron las placas del medio GC antes de ser inoculadas, colocándolas en una estufa en posición invertida y con la tapa entreabierto durante unos 5 minutos. Con una micropipeta se transfirieron 2 µl de cada suspensión problema en la superficie del agar en áreas circulares con diámetros de 5 a 7 mm, consiguiendo un inóculo final de aproximadamente 10⁴ UFC. Se inocularon las placas empezando por la placa de menor concentración de antibiótico hasta la de mayor concentración. Posteriormente, se incubaron las placas en posición invertida durante 18-24 horas a 35 °C en atmosfera con humedad del 70% y suplementada con 5% CO₂.

3.4.2.2.4. Control de calidad

Como control de calidad del medio GC se inocularon dos placas sin antibiótico, una antes (control de crecimiento inicial) y la otra después (control de crecimiento final) de inocular los medios con antibiótico. También se inoculó la cepa control *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 en cada medio con el fin de realizar un control de calidad de la interpretación.

3.4.2.2.5. Lectura e interpretación de los resultados

Transcurrido el tiempo de incubación (18-24 h) se procedió a la lectura de los resultados. La lectura se realizó anotando el valor de la CMI. No se consideró crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo. Los

resultados se interpretaron según las categorías establecidas por EUCAST (255) (Tabla 4) y CLSI (254) (Tabla 5): sensible, sensibilidad intermedia o resistente. Solo se validaron los resultados obtenidos tras comprobar que todas las cepas crecieron en los medios de control de crecimiento sin antibiótico inicial y final, y que la CMI mostrada por la cepa control (*N. gonorrhoeae* ATCC 49226) se encontraba dentro de los rangos establecidos por CLSI (254) (Tabla 4).

Tabla 4. Antimicrobianos utilizados en el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST (255).

Antimicrobiano	N. <i>gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ¹	Puntos de corte según EUCAST (mg/l)		
		S	I	R
Cefixima	0,004-0,03	≤0,125	-	>0,125
Ceftriaxona	0,004-0,015	≤0,125	-	>0,125

* S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; ¹ Según los criterios de CLSI (254).

Tabla 5. Antimicrobianos utilizados en el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por CLSI (254).

Antimicrobiano	N. <i>gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ¹	Puntos de corte según CLSI (mg/l)		
		S	I	R
Cefixima	0,004-0,03	≤0,25	-	>0,25
Ceftriaxona	0,004-0,015	≤0,25	-	>0,25

* S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; ¹ Según los criterios de CLSI (254).

3.4.2.3 Método E-test

El método Épsilon-test o E-test se basa en el uso de tiras de plástico impregnadas con un gradiente de concentración de un antibiótico específico. Las tiras se depositan sobre un medio previamente inoculado con una suspensión del microorganismo a estudio, creándose un halo de inhibición similar al de la difusión en agar disco-placa, pero con forma de elipse.

3.4.2.3.1. Elaboración del medio

El medio empleado fue el agar GC (Becton Dickinson) con 1% de suplemento de crecimiento definido Vitox (OXOID™), el cual fue elaborado tal y como se describe en el apartado 3.4.2.1.1. del método de difusión en agar disco-placa.

3.4.2.3.2. Preparación del inóculo

El inóculo fue preparado y extendido por la placa de medio GC tal y como se describe en el apartado 3.4.2.1.2. del método de difusión en agar disco-placa. Antes de dispensar las tiras de E-test, se dejaron las placas unos 15 minutos a temperatura ambiente para que se absorbiera el exceso de humedad en la superficie del agar.

3.4.2.3.3. Dispensación de las tiras de E-test

Se colocaron las tiras de E-test de azitromicina en las placas inoculadas utilizando pinzas estériles. Se incubaron las placas a 35°C, con una atmosfera de un 70% de humedad y suplementada con 5% de CO₂.

3.4.2.3.4. Lectura e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los resultados se realizó 18-24 h después de la incubación. La CMI se tomó como la concentración más baja de azitromicina, señalada en la tira de E-test, que confluye con la elipse formada por la inhibición del crecimiento del microorganismo. La interpretación se realizó según los criterios establecidos por EUCAST (255) (Tabla 6), pues CLSI no establece puntos de corte para azitromicina (254).

Tabla 6. Puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para la interpretación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a azitromicina (255).

Antimicrobiano	Puntos de corte según EUCAST (mg/l)		
	S	I	R
Azitromicina	≤0,25	0,25 < I ≤0,5	>0,5

* S: sensible; R: resistente.

3.4.2.4. Correlación entre los métodos de sensibilidad antimicrobiana

Se estudió la correlación categórica y cuantitativa existente entre los distintos métodos de sensibilidad antimicrobiana utilizados. Se estudió la correlación de los métodos de difusión en agar disco-placa y E-test para azitromicina, y la de los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar para cefixima y ceftriaxona. También se estudió la correlación cuantitativa entre azitromicina y eritromicina mediante el método de difusión en agar disco-placa, ya que la eritromicina se ha empleado por algunos estudios para obtener una idea orientativa de la resistencia a azitromicina (280).

Para estudiar la correlación categórica se calculó la V de Cramer. Las categorías que se utilizaron para calcular dicho coeficiente fueron los establecidos por EUCAST y CLSI: sensible, sensibilidad intermedia y resistente. Para estudiar la correlación cuantitativa se realizó una regresión lineal, en la que se logra el coeficiente de correlación

de Pearson (r) o el de Spearman (r_s), dependiendo si se cumple la normalidad de la muestra. La interpretación de la V de Cramer se realizó de acuerdo a Rea y Parker (2004) (281), cuyos criterios de interpretación se muestran en la Tabla 7. La interpretación de los coeficientes de correlación se realizó de acuerdo a Hopkins (2000) (282), cuyos criterios se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7. Interpretación de la V de Cramer (281).

V de Cramer	Interpretación
<0,10	Asociación nula
0,11-0,20	Asociación débil
0,21-0,40	Asociación moderada
0,41-0,60	Asociación relativamente alta
0,61-0,80	Asociación alta
0,81-1,00	Asociación muy alta

Tabla 8. Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson (282).

Coefficiente de correlación	Interpretación
0,00 a 0,10 (0,00 a -0,10)	Correlación nula
0,10 a 0,350 (-0,10 a -0,30)	Correlación baja
0,30 a 0,50 (-0,30 a -0,50)	Correlación moderada
0,50 a 0,70 (-0,50 a -0,70)	Correlación alta
0,70 a 0,90 (-0,70 a -0,90)	Correlación muy alta
0,90 a 1,00 (-0,90 a -1,00)	Correlación perfecta

3.4.2.4 Detección de resistencia plasmídica a penicilina

La presencia de producción de β -lactamasas se detectó mediante la prueba Nitrocefín SRO112C (OXOID™). Esta prueba se basa en la detección de la hidrólisis de una cefalosporina cromogénica.

3.4.3 Caracterización de los aislados de *N. gonorrhoeae*

Para llevar a cabo el tipado molecular de los aislados se utilizó el método NG-MAST siguiendo la metodología descrita por *Martin et al.* (268). Se extrajo el ADN y se

amplificaron, mediante PCR, fragmentos internos de los genes *porB* y *tbpB*. A continuación estos fragmentos se secuenciaron en los 2 sentidos y se analizó la secuencia.

3.4.3.1. Extracción del ADN

Las cepas de *N. gonorrhoeae* almacenadas a -80°C fueron cultivadas en agar GC-Lect™ (Becton Dickinson) e incubadas durante 18-24 horas a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad suplementada con 5% de CO₂. Tras la incubación se suspendieron unas colonias en el medio *apiR Suspension Medium* (bioMérieux) hasta lograr una turbidez equivalente a 4 en la escala McFarland. Se vortió la suspensión durante 1 minuto y se realizó un choque térmico calentando la suspensión a 95°C durante 10-15 minutos y posteriormente enfriándolo a -80°C durante 2-5 min. Después se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos y se congeló el sobrenadante a -20°C hasta su posterior procesamiento.

3.4.3.2. Selección de fragmentos internos de *porB* y *tbpB*

Las regiones internas variables de los genes *porB* y *tbpB* se secuenciaron en ambas direcciones mediante el uso de un único par de cebadores que se identificaron a partir de alineaciones de las secuencias disponibles en GenBank mediante el uso del software ClustalX (versión 1.8, disponible en: <http://www.igbmc.ustrasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>) (268).

Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento interno del gen *porB* fueron diseñados mediante el uso de secuencias conservadas que codifican los alelos *por* IA e IB. Estos amplifican un fragmento de 737 pb:

- Forward: 5'⁻³⁵⁰CAA GAA GAC CTC GGC AA³⁶⁶-3'
- Reverse: 5'⁻¹⁰⁸⁶CCG ACA ACC ACT TGG T¹⁰⁷¹-3'

Los cebadores para *tbpB* fueron diseñados utilizando secuencias conservadas, y amplifican un fragmento de 589 pb:

- Forward: 5'⁻¹⁰⁹⁸CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC¹¹¹⁸-3'
- Reverse: 5'⁻¹⁶⁸⁶TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG¹⁶⁶⁶-3'

La numeración se basa en la secuencia *por* de la cepa MS11 (número de acceso GenBank M21289) (283) y en la secuencia *tbpB* de la cepa UU1008 (número de acceso GenBank 2286066) (284).

3.4.3.3. Amplificación de los fragmentos *porB* y *tbpB*

La PCR del fragmento del gen *porB* se realizó en volúmenes de reacción de 20 µl usando capilares de vidrio que se incorporan en un carrusel de polipropileno. Cada PCR contenía 20 pmol de cada cebador, 10 µl de mezcla de reactivo LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 5 µl de lisado de ADN, y agua para PCR hasta alcanzar un volumen total de 20 µl. Para llevar a cabo la PCR se utilizó el termociclador LightCyclerR 2.0 (Roche). Para la amplificación del fragmento del gen *porB*, el proceso de PCR comprende una desnaturalización inicial de 4 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 60 segundos a 72°C, seguido por una temperatura de fusión de 5 segundos a 95°C, una extensión final de 30 segundos a 72°C y un posterior enfriamiento a 4°C. La amplificación del fragmento del gen *tbpB* se realizó con los cebadores *tbpB*, utilizando el mismo método, pero con una temperatura de hibridación de 69°C. Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados con el equipo UltraClean® PCR Clean-Up (MoBio laboratories, Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3.4. Secuenciación de los fragmentos *porB* y *tbpB*

Los fragmentos internos de los genes *porB* y *tbpB* amplificados por PCR se secuenciaron en ambas direcciones (“forward” y “reverse”) con los mismos cebadores utilizados en la amplificación inicial de PCR mediante el uso del equipo “BigDye Terminator Cycle Sequencing” (version 3.1; Applied Biosystems™) y se manejaron con un secuenciador de ADN “HITACHI 3130 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems™). Las reacciones de secuenciación trazadas en las direcciones “forward” y “reverse” fueron analizadas y editadas con el uso del software “Secuencing Analysis” (version 5.3; Applied Biosystems) y cortadas a una longitud establecida.

3.4.3.5. Análisis de las secuencias

En el caso del gen *porB*, se utiliza una secuencia de 490 pb para definir los alelos, a partir de una secuencia conservada (TTGAA) que se extiende desde el nucleótido 455 en la secuencia de la cepa MS11 (283). Para definir los alelos del gen *tbpB*, se selecciona una secuencia de 390 pb, a partir de una secuencia conservada (CGTCTGAA) que se extiende desde el nucleótido 1118 en la secuencia de la cepa UU1008 (284).

Las secuencias fueron introducidas en la base de datos NG-MAST (www.ng-mast.net), obteniéndose así el alelo correspondiente a cada gen. Combinando los dos alelos se obtuvo el ST de cada cepa.

3.4.3.6. Clasificación de los secuenciotipos en genogrupos

Siguiendo la metodología descrita por Chisholm *et al.* (2013) (271), se analizaron los alelos de los ST predominantes (aquellos representados por ≥ 10 aislados) con los alelos del resto de ST para determinar si los ST predominantes formaban parte de un mayor grupo de ST estrechamente relacionados. La similitud entre los alelos se realizó alineando las distintas secuencias para observar el número de pb diferentes. Por ejemplo, para determinar los ST que pertenecen al mismo genogrupo que ST1407 (*porB* 908 y *tbpB* 110), los alelos de ST1407 fueron comparados con los alelos *porB* de los ST que tienen *tbpB* 110, y con los alelos *tbpB* de los ST que tienen *porB* 908. Los distintos ST fueron incluidos en un mismo genogrupo si compartían un mismo alelo y el otro alelo era similar a $\geq 99\%$ (≤ 5 pb de diferencia para *porB* y ≤ 4 pb para *tbpB*). Los genogrupos fueron nombrados utilizando la letra “G” seguida del ST predominante del grupo. Por ejemplo, el genogrupo donde ST1407 es el ST predominante recibe la nominación de G1407.

Se analizaron los principales genogrupos y ST observados para asociarlos a la resistencia a los antimicrobianos analizados y a las características demográficas de los pacientes.

3.5. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados descriptivos para las variables cuantitativas se representaron como media, mediana y rango (mínimo-máximo). Las variables categóricas se representaron como frecuencia y porcentaje. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución a la hora de analizar las variables cuantitativas (edad de los pacientes, CMI y mm de halo de inhibición).

Para observar si existen diferencias significativas en la CMI₅₀ de un año a otro se utilizó la prueba t de Student, o la prueba U de Mann-Whitney si no se cumplía la normalidad de la distribución.

Para analizar la relación entre variables categóricas se realizó la prueba del χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher. Para asociar los ST y genogrupos con las características demográficas de los pacientes y con la resistencia antimicrobiana se calcularon el “odds ratio” (OR) y el intervalo de confianza (IC) de 95%. Para comprobar si los OR eran significativamente diferentes se utilizó la prueba de Chi Cuadrado (χ^2). No se pudo realizar este análisis cuando alguna de las celdas de las tablas de contingencia tenía un valor igual a cero, en cuyo caso se realizó el test exacto de Fisher.

Para comprobar si existe asociación entre las variables cuantitativas (por ejemplo, mm de halo de inhibición de azitromicina y eritromicina) se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) si se ajustan a una distribución normal o el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) si la distribución no cumple los criterios de normalidad.

Un resultado se consideró estadísticamente significativo siempre que el p-valor fuese inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico SPSS 23.0.

3.6. Consideraciones éticas

El estudio realizado es de carácter descriptivo, por lo que durante su realización solo se ha recopilado información existente, sin que se haya realizado a los pacientes pruebas diagnósticas o se les haya sometido a tratamiento alguno para llevar a cabo la investigación. Toda la información recopilada para el estudio se ha considerado confidencial y se ha utilizado única y exclusivamente en el ámbito profesional. Se obtuvo permiso para acceder a la revisión de las historias clínicas a través del comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Basurto.

4. RESULTADOS

4.1. Incidencia de la infección gonocócica

Durante el periodo de tiempo de estudio se detectaron un total de 360 aislados pertenecientes a 284 pacientes. Nueve pacientes sufrieron dos episodios durante el periodo de tiempo de estudio, y un paciente tres episodios. Dado que la unidad de análisis de este estudio es el episodio en el que se diagnostica la infección, el tamaño muestral del estudio fue de 295 episodios.

En el año 2014 se detectaron 190 aislados, correspondientes a 158 episodios, lo que supone una incidencia de 45,59 casos por 100.000 habitantes y, en el año 2015 se detectaron 170 aislados correspondientes a 137 episodios, lo que supone una incidencia de 40,66 casos por 100.000 habitantes.

4.2. Características demográficas de los pacientes

El 18% de los pacientes que sufrieron una infección gonocócica en el periodo 2014-2015 eran mujeres y el 82% de hombres. Se obtuvo la edad del en el 85,76% de los casos (n = 253), mostrando una media de 33,92 años, mediana de 32,16 años y rango de 16-81 años. El 19% de los casos se encontraban en el rango de edad de 16-24 años, el 34,8% en el rango de 25-34 años, el 27,7% en el rango de 35-44 años y el 18,6% presentaron una edad de ≥ 45 años. Los datos de esos 253 pacientes se muestran en la Figura 3.

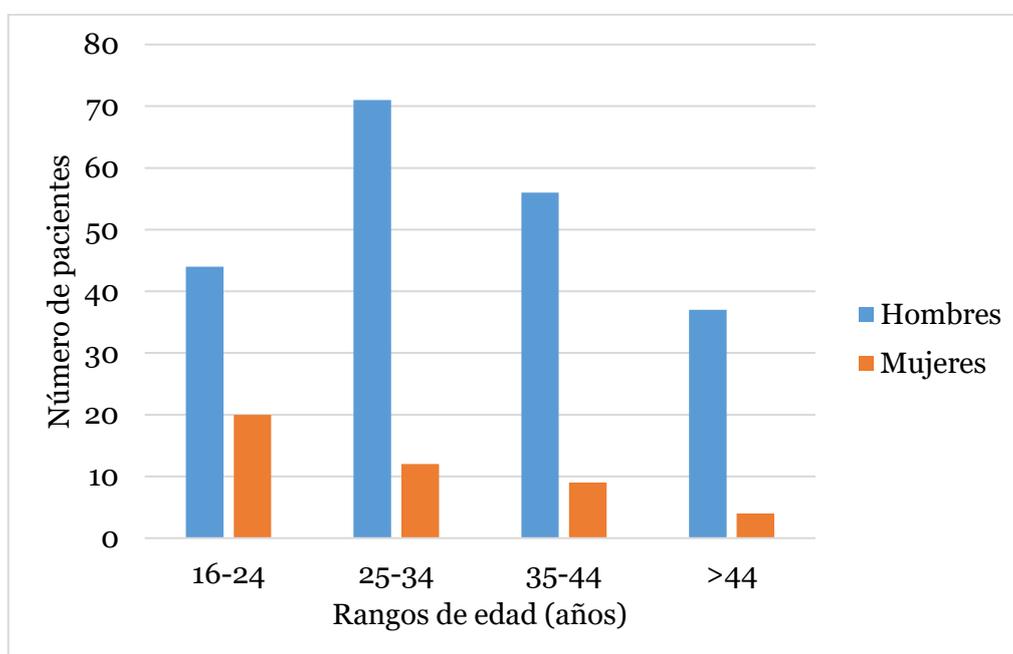


Figura 3. Distribución por edad y género de los 253 pacientes cuyas edades estaban disponibles.

4.3. Características de las muestras

De las 360 muestras analizadas, el 54,17% eran exudados uretrales, el 20,56% rectales, el 10,83% muestras faríngeas, el 8,61% endocervicales y el 5,56% vaginales. También se encontró una muestra sanguínea (0,28%). La distribución de las muestras se presenta en la Figura 4.

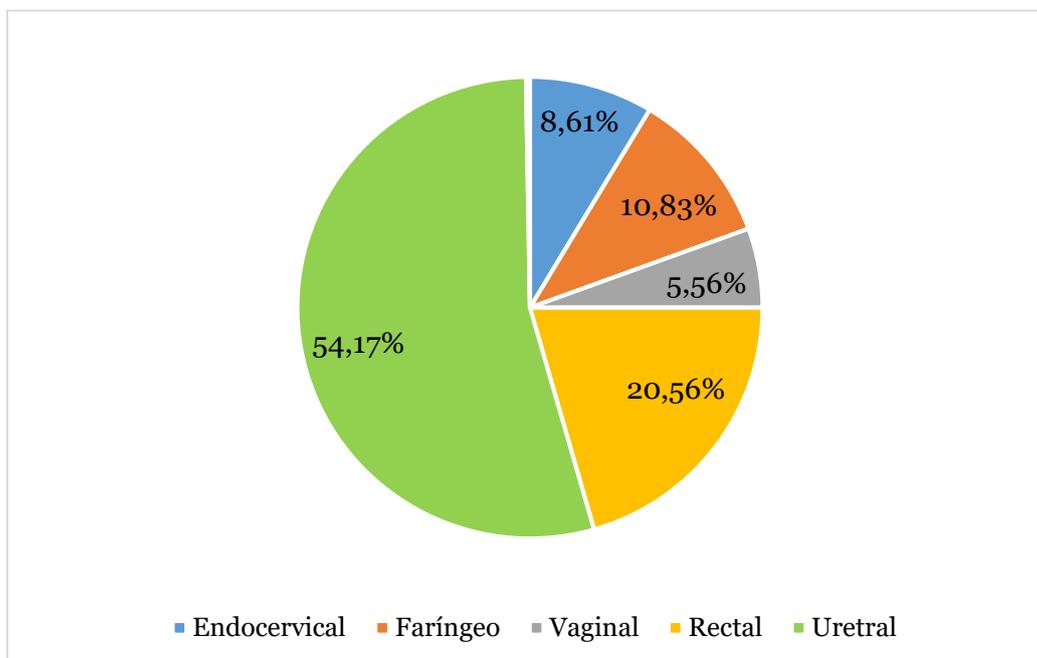


Figura 4. Tipos de muestra analizadas en el trabajo. La muestra sanguínea no está representada en el gráfico por su baja presencia (1 muestra, 0,28% del total).

El 76,94% de las muestras provienen de la Consulta Especializada Bombero Etxaniz de Bilbao y el 5,56% de diferentes Centros de Salud de Bilbao. El resto de muestras provienen del Hospital Universitario Basurto de Bilbao. De estas muestras, el 9,44% (sobre el total de 360 muestras) provienen de la Consulta de Microbiología del hospital, el 7,78% del Servicio de Urgencias y el 0,28% de la Consulta de Ginecología.

4.4. Sensibilidad antimicrobiana

4.4.1. Difusión en agar disco-placa

Se midieron los diámetros de los halos de inhibición, en mm, producidos en los 360 aislados en presencia de los siguientes antibióticos: penicilina, cefixima, ceftriaxona, cefepima, cefuroxima, ciprofloxacino, espectinomicina, gentamicina, tetraciclina, azitromicina y eritromicina. Con dichos diámetros se calcularon los valores que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores estadísticos calculados a partir de los diámetros de halo producidos por los 360 aislados de *N. gonorrhoeae* en presencia de cada antimicrobiano.

Antimicrobiano	Rango (mm halo)	Media (mm halo)	Mediana (mm halo)
Penicilina	0-48	32,53	36
Cefixima	31-54	41,54	42
Ceftriaxona	36-58	45,72	46
Cefepima	15-58	42,38	42
Cefuroxima	14-58	40,41	42
Ciprofloxacino	0-55	31,05	44
Espectinomicina	21-36	27,91	28
Gentamicina	20-41	27,65	28
Tetraciclina	10-48	36,30	36
Azitromicina	0-44	34,05	34
Eritromicina	0-46	30,19	30

Se realizó la interpretación de los resultados obtenidos. Los resultados de cefixima, ceftriaxona, cefepima, cefuroxima, ciprofloxacino, espectinomicina y tetraciclina fueron interpretados de acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI (254). Los resultado de azitromicina fueron interpretados de acuerdo a BSAC (278) y los de gentamicina de acuerdo a Bala *et al.* (2016) (279).

- El 1,67% de los aislados fueron sensibles a penicilina, el 81,94% presentaron sensibilidad intermedia y el 16,39% fueron resistentes. De los 34 aislados productores de β -lactamasa, 32 fueron resistentes a penicilina y los 2 restantes presentaron sensibilidad intermedia.
- El 100% de los aislados fueron sensibles a cefixima, ceftriaxona, espectinomicina y gentamicina.
- El 95,28% de los aislados fueron sensibles a cefepima y el 4,72% resistentes.
- El 89,72% de los aislados fueron sensibles a cefuroxima, el 4,44% presentaron sensibilidad intermedia y el 5,83% fueron resistentes.
- El 53,89% de los aislados fueron sensibles a ciprofloxacino, el 3,61% presentaron sensibilidad intermedia y un 42,50% fueron resistentes. 65 aislados (18,05%) no produjeron halo de inhibición.

- El 46,11% de los aislados fueron sensibles a tetraciclina, el 45,28% presentaron sensibilidad intermedia y el 8,61% fueron resistentes.
- El 96,94% de aislados fueron sensibles a azitromicina y el 3,06% resistentes. Uno de los aislados resistentes mostró una total ausencia del halo de inhibición (0 mm).

CLSI, EUCAST y BSAC no han establecido puntos de corte para eritromicina por el método de difusión en agar disco- placa. La Tabla 10 resume la interpretación de los resultados logrados con todos los antibióticos con el método de difusión en agar disco- placa.

Tabla 10. Interpretación de los resultados logrados con el método de difusión en agar disco- placa.

Antimicrobiano	Sensibilidad antimicrobiana			
	S (%)	I (%)	R (%)	Total (%)
Penicilina	6 (1,67%)	295 (81,94%)	59 (16,39%)	360 (100%)
Cefixima	360 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	360 (100%)
Ceftriaxona	360 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	360 (100%)
Cefepima	343 (95,28%)	0 (0%)	17 (4,72%)	360 (100%)
Cefuroxima	323 (89,72%)	16 (4,44%)	21 (5,83%)	360 (100%)
Ciprofloxacino	194 (53,89%)	13 (3,61%)	153 (42,50%)	360 (100%)
Gentamicina	360 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	360 (100%)
Espectinomicina	360 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	360 (100%)
Tetraciclina	166 (46,11%)	163 (45,28%)	31 (8,61%)	360 (100%)
Azitromicina	349 (96,94%)	0 (0%)	11 (3,06%)	360 (100%)
Eritromicina ¹	-	-	-	360 (100%)

*S: sensible. I: sensibilidad intermedia. R: resistente. ¹Puntos de corte no establecidos.

4.4.2. Dilución en agar

Todos los aislados fueron interpretados como sensibles a cefixima y ceftriaxona tomando como referencia los puntos de corte establecidos por EUCAST y CLSI, aunque con diferencias notables. Tomando como referencia los puntos de corte establecidos por EUCAST para cefixima y ceftriaxona (R: CMI > 0,125 mg/L para ambos antibióticos), 10 aislados se encontraban a dos diluciones de considerarse resistentes a cefixima y 19 aislados a ceftriaxona, pues todos ellos presentaron CMI de 0,060 mg/L. Además, tres

aislados se encontraban a una sola dilución (CMI = 0,125 mg/L) de considerarse resistentes a ceftriaxona. Tomando como referencia los puntos de corte establecidos por CLSI (R: CMI > 0,25 mg/L), todos los aislados mencionados se encontraban a una dilución más de considerarse resistentes, en comparación con EUCAST.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ observadas para cefixima y ceftriaxona durante el periodo de estudio (2014-2015) fueron de 0,004 mg/L y 0,015 mg/L para cefixima y 0,004 mg/L y 0,030 mg/L para ceftriaxona. De 2014 a 2015 se observó un incremento en la CMI₉₀ de cefixima, de 0,015 mg/L a 0,030 mg/L, y una reducción de la CMI₉₀ de ceftriaxona, de 0,030 mg/L a 0,015 mg/L. La CMI₅₀ de cefixima se ha mantenido en 0,004 mg/L durante los dos años, pero la CMI₅₀ de ceftriaxona se redujo de 0,008 mg/L a 0,004 mg/L, aunque dicha reducción no es significativa (p = 0,078). Las CMI₅₀ y CMI₉₀ observadas se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Distribución de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefixima y ceftriaxona en el periodo de estudio.

Antimicrobiano	2014		2015		Total	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Cefixima	0,004	0,015	0,004	0,030	0,004	0,015
Ceftriaxona	0,008	0,030	0,004	0,015	0,004	0,015

4.4.3. E-test

De acuerdo a los puntos de corte establecidos por EUCAST para azitromicina, 228 aislados (63,33%) fueron interpretados como sensibles, 99 (27,50%) presentaron sensibilidad intermedia y 33 (9,17%) fueron resistentes. El aislado que se mostró totalmente resistente (halo de inhibición de 0 mm) por el método de agar difusión en disco-placa presentó una CMI de >256 mg/L por el método E-test. En la Tabla 12 se presenta la distribución de los aislados resistentes y de sensibilidad intermedia.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ a azitromicina observadas durante el periodo de estudio (2014-2015) fueron de 0,25 mg/L y 0,50 mg/L respectivamente, aunque se observa una reducción desde el año 2014 (CMI₅₀ = 0,38 mg/L y CMI₉₀ = 0,75 mg/L) a 2015 (0,19 mg/L y 0,38 mg/L). La reducción de la CMI₅₀ es significativa (p < 0,001). Las CMI₅₀ y CMI₉₀ observadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12. Distribución y CMI de los aislados de *N. gonorrhoeae* con sensibilidad intermedia y resistencia a azitromicina obtenidos mediante el método E-test.

	Sensibilidad a azitromicina							Total de aislados
	I		R					
CMI (mg/L)	0,38	0,5	0,75	1	1,5	4	>256	
Nº de aislados (%)	61 (16,94)	38 (10,56)	24 (6,67)	5 (1,39)	2 (0,56)	1 (0,28)	1 (0,28)	132 (36,66)

*I: sensibilidad intermedia. R: resistencia.

Tabla 13. Distribución de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina en el periodo de estudio.

Antimicrobiano	2014		2015		Total	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Azitromicina	0,38	0,75	0,19	0,38	0,25	0,50

4.4.4. Aislados multirresistentes y de resistencia extendida de *N. gonorrhoeae*

Para el estudio de cepas MR y XR se tuvieron en cuenta todos los antibióticos testados según el método de difusión en agar disco-placa excepto eritromicina, cefepima y cefuroxima, ya que en la actualidad no suponen una alternativa terapéutica para la infección gonocócica.

De los 360 aislados testados, seis fueron sensibles a todos los antibióticos considerados como posible opción terapéutica (penicilina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomicina, gentamicina, tetraciclina y azitromicina). El 29,44% de los aislados fueron resistentes o presentaron sensibilidad intermedia a un solo antibiótico (penicilina o ciprofloxacino), el 36,67% a dos antibióticos, el 31,11% a tres antibióticos y el 1,11% a cuatro antibióticos.

De acuerdo a Tapsall *et al.* (2009), se considera MR a aquel aislado resistente a al menos un antimicrobiano (dos antimicrobianos en caso de aislados XR) recomendado generalmente para el tratamiento en monoterapia de la infección gonocócica (CES y espectinomicina), además de resistente a al menos dos de los antimicrobiano (tres

antimicrobianos en caso de aislados XR) menos utilizados en el tratamiento (penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, etc.) (115). De acuerdo a esta definición, ninguno de los aislados estudiados era MR o XR, pues ninguno se mostró resistente a cefixima, ceftriaxona o espectinomicina. Sin embargo, de acuerdo a Tribuddharat *et al.* (2017), se considera MR a aquel aislado resistente a al menos tres clases de antibióticos (285), un requisito que cumplieron 14 aislados (3,89%), la mayoría de ellos resistentes a penicilinas, ciprofloxacino y tetraciclina. Estos aislados se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Distribución de los aislados de *N. gonorrhoeae* MR de acuerdo a Tribuddharat *et al.* (2017) (285).

Resistencia a antimicrobianos	Aislados resistentes
Penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina	11
Ciprofloxacino, azitromicina y tetraciclina	1
Penicilina, azitromicina y tetraciclina	1
Penicilina, ciprofloxacino, azitromicina y tetraciclina	1
Total	14

4.4.5. Correlación entre los diferentes métodos de sensibilidad antimicrobiana

4.4.5.1. Correlación categórica

Se calculó la V de Cramer para observar la correlación categórica entre los diferentes métodos de sensibilidad antimicrobiana utilizados para testar azitromicina, cefixima y ceftriaxona. Las categorías utilizadas para calcular la V de Cramer para azitromicina mediante E-test fueron sensible, sensibilidad intermedia y resistente. Sin embargo, el BSAC no emplea la categoría de sensibilidad intermedia al clasificar la azitromicina mediante la difusión en agar disco-placa, por lo que en este caso solo se utilizaron las categorías sensible y resistente. CLSI y EUCAST también se limitan a las categorías sensible y resistente para clasificar cefixima y ceftriaxona. Los resultados logrados son los siguientes:

- Se analizó la asociación categórica entre las técnicas E-test y difusión en agar disco-placa para azitromicina. Para ello se calculó la V de Cramer, logrando un resultado de 0,559, que, de acuerdo a Rea y Parker (2004) (281), significa una

asociación relativamente alta. El resultado es estadísticamente significativo ($p < 0,001$, prueba del χ^2 de Pearson). La Tabla 15 muestra la concordancia observada entre los resultados de las dos técnicas.

- El 100% de los aislados fueron sensibles a cefixima y ceftriaxona al realizar los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar, de modo que la concordancia categórica entre ambas técnicas fue del 100%.

Tabla 15. Concordancia categórica entre los resultados obtenidos para azitromicina mediante las técnicas E-test y difusión en agar disco-placa.

		E-test			
		S	I	R	Total
Difusión en agar disco-placa	S	228 (63,3%)	99 (27,5%)	22 (6,1%)	349 (96,9%)
	R	0 (0%)	0 (0%)	11 (3,1%)	11 (3,1%)
	Total	228 (63,3%)	99 (27,5%)	33 (9,2%)	360 (100%)

*S: Sensible. I: Sensibilidad intermedia. R: resistente.

3.5.2. Correlación cuantitativa

Se analizó la correlación cuantitativa entre las técnicas E-test y difusión en agar disco-placa para azitromicina. En el caso de cefixima y ceftriaxona se compararon los métodos de difusión en agar disco-placa y la dilución en agar. También se compararon los resultados obtenidos mediante el método de difusión en agar disco-placa para azitromicina y eritromicina. Para analizar la correlación se realizó una regresión lineal y se calculó el coeficiente de correlación de Person (r) cuando se cumplía la normalidad en la distribución de la muestra, o el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) cuando no se cumplía.

Se realizó una regresión lineal para observar la correlación entre los métodos de difusión en agar disco-placa y E-test para azitromicina, la cual se muestra en la Figura 5. La correlación lograda fue $r_s = -0,734$ ($p < 0,001$), que, de acuerdo a Hopkins (2000) (282), significa que existe una correlación negativa muy alta.

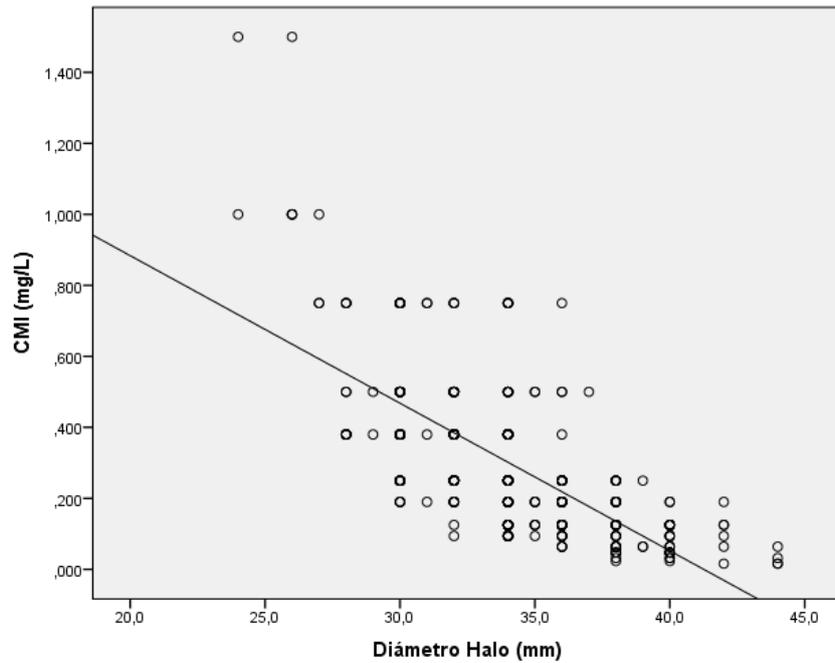


Figura 5. Regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los métodos E-test y difusión en agar disco-placa para azitromicina.

Se realizó una regresión lineal para analizar la correlación cuantitativa entre la técnica de difusión en agar disco-placa y la dilución en agar para cefixima, la cual se muestra en la Figura 6. De acuerdo a Hopkins (2000) (282), la correlación observada fue negativa y moderada ($r_s = -0,467$, $p < 0,001$).

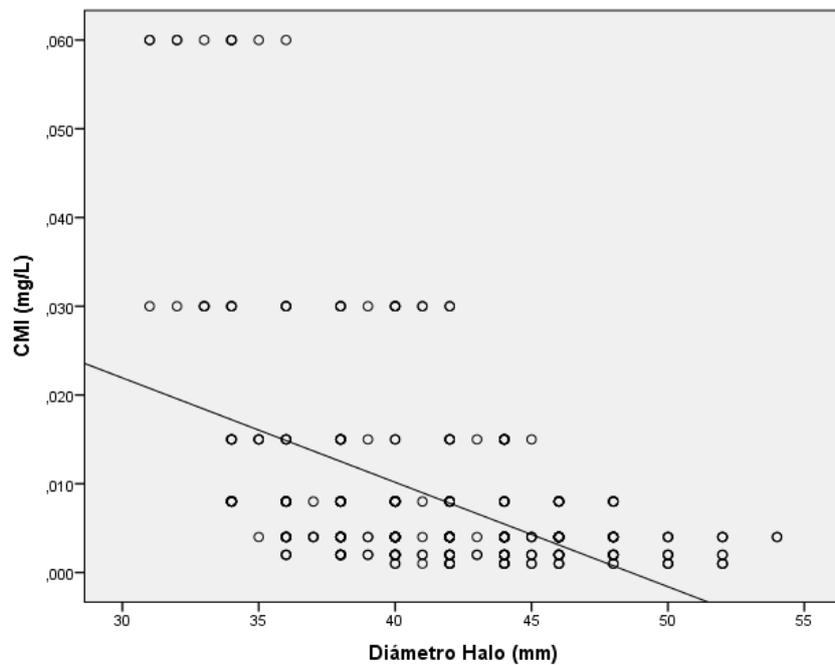


Figura 6. Regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los métodos dilución en agar y difusión en agar disco-placa para cefixima.

Se realizó una regresión lineal para analizar la correlación cuantitativa entre la difusión en agar disco-placa y la dilución en agar para ceftriaxona, la cual se muestra en la Figura 7. De acuerdo a Hopkins (2000) (282), la correlación observada fue negativa y moderada ($r_s = -0,419$, $p = 0,000$).

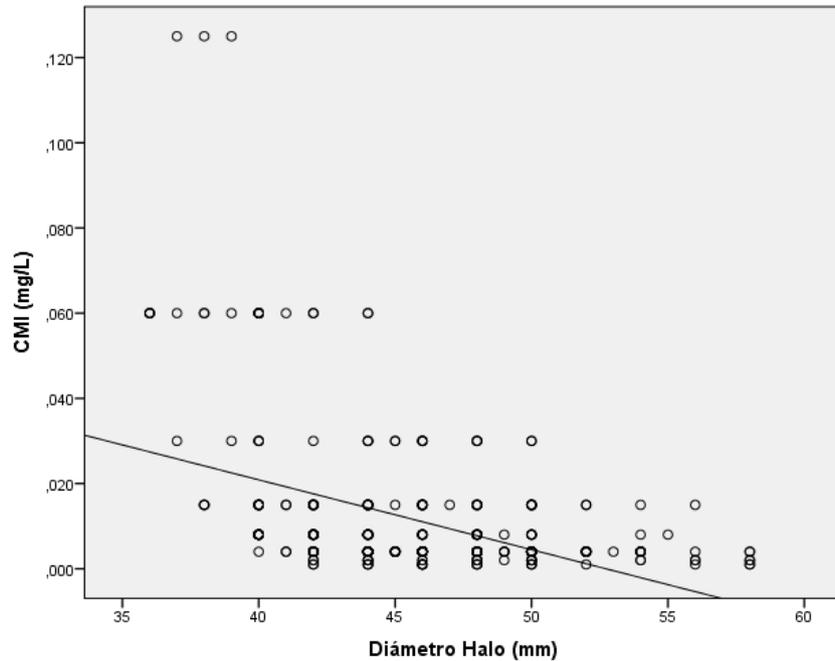


Figura 7. Regresión lineal de los resultados obtenidos en los métodos dilución en agar y difusión en agar disco-placa para ceftriaxona.

Se realizó una regresión lineal para observar la correlación entre azitromicina y eritromicina mediante el método de difusión en agar disco-placa, la cual se muestra en la Figura 8. La correlación lograda fue positiva y muy alta ($r_s = 0,762$, $p = 0,000$) de acuerdo a Hopkins (2000) (282).

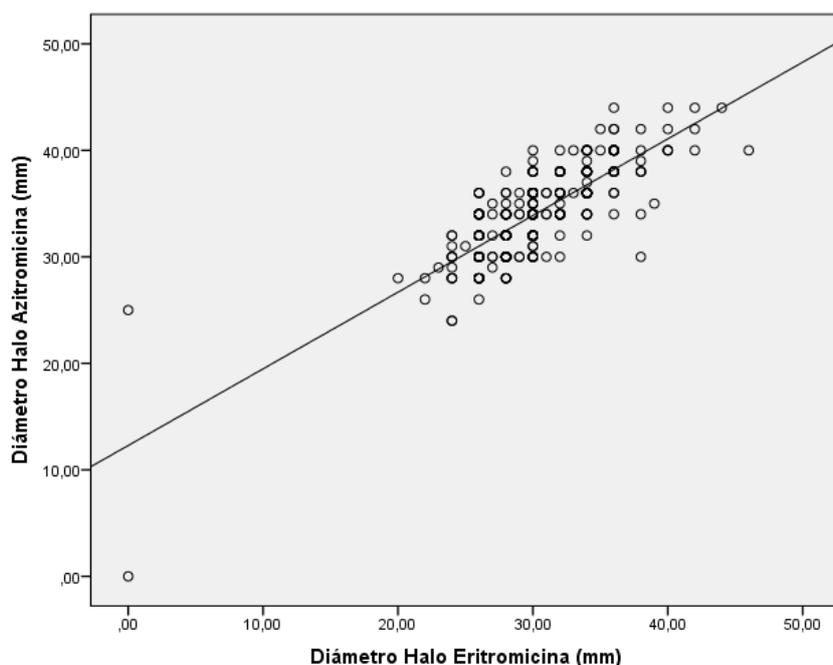


Figura 8. Regresión lineal de los resultados obtenidos con el método de difusión en agar disco-placa con eritromicina y azitromicina.

4.5. Caracterización de los aislados de *N. gonorrhoeae*

Se realizó la tipificación molecular de todos los aislados de *N. gonorrhoeae* durante el período de estudio excepto uno ($n = 359$) porque se perdió la viabilidad de dicho aislado. 40 aislados no se consiguieron caracterizar, ya que los alelos *porB* y *tbpB* obtenidos no se correspondían con ningún ST según la base de datos online NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/>). Estos aislados podrían corresponder a nuevos ST que no han sido descritos hasta ahora.

Respecto a los 319 aislados que fueron completamente caracterizados se obtuvieron 71 ST distintos que correspondían a 56 alelos *porB* y 28 alelos *tbpB* distintos. 31 ST fueron representados por un solo aislado, 12 ST por dos aislados, 8 ST por tres aislados y los restantes 20 ST por cuatro o más aislados. Los ST de mayor frecuencia, representados en la Figura 9 y formados por al menos 10 aislados fueron los siguientes: ST4186 (51 aislados, el 16,0%), ST5624 y ST5119 (24 aislados cada uno, el 7,5%), ST1861 (17 aislados, el 5,3%), ST2992 y ST1407 (15 aislados cada uno, el 4,7%) y ST5441 (13 aislados, el 4,1%).

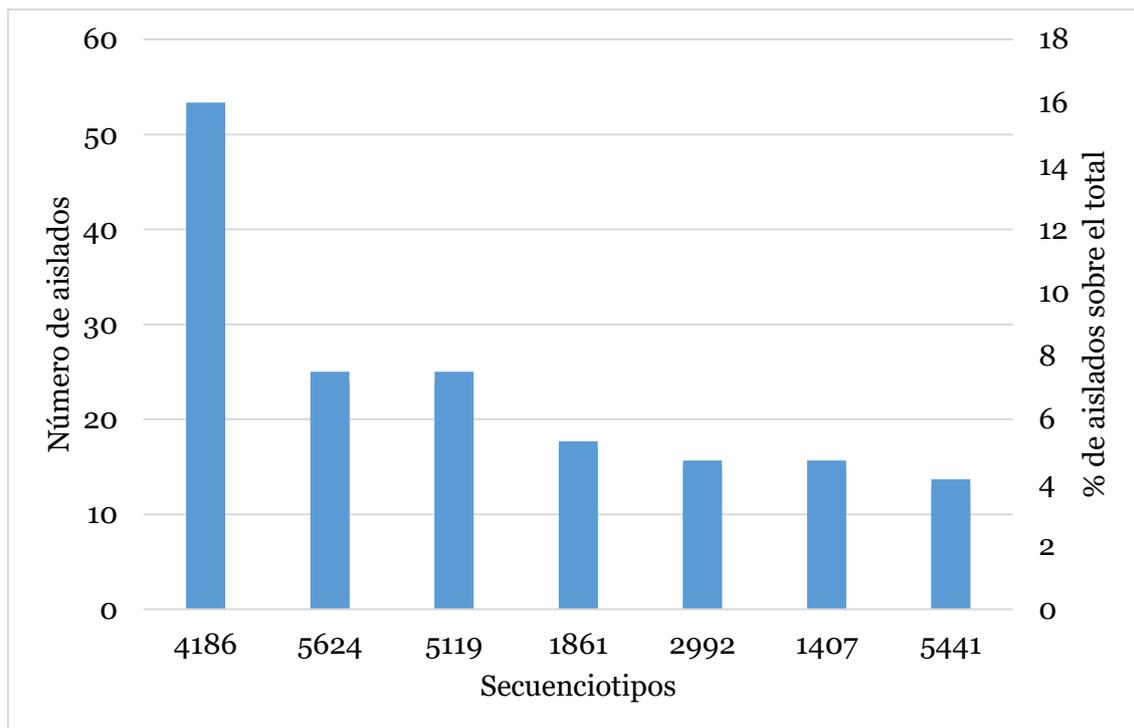


Figura 9. ST predominantes observados mediante la técnica NG-MAST.

4.5.1. Clasificación de los secuenciotipos en genogrupos

Para clasificar los ST en genogrupos se siguió la metodología descrita por Chisholm *et al.* (2013) (271). Para ello se alinearon las secuencias de los diferentes ST que tuvieran un alelo en común para observar el número de pb diferentes. Por ejemplo, para determinar los ST que pertenecen al mismo genogrupo que ST1407 (*porB* 908 y *tbpB* 110), los alelos de ST1407 fueron comparados con los alelos *porB* de los ST que tienen *tbpB* 110, y con los alelos *tbpB* de los ST que tienen *porB* 908. Los distintos ST fueron incluidos en un mismo genogrupo si compartían un mismo alelo y el otro alelo era similar al $\geq 99\%$ (≤ 5 pb de diferencia para *porB* y ≤ 4 pb para *tbpB*). Se obtuvieron 3 genogrupos, los cuales fueron nombrados utilizando la letra “G” seguida del ST predominante del grupo. Por ejemplo, el genogrupo donde ST1407 es el ST predominante pasa a nombrarse G1407. Los detalles sobre los genogrupos obtenidos se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Genogrupos obtenidos y ST que forman cada genogrupo.

Genogrupo n (%) ¹	ST predominante (n)	ST del mismo grupo	
		Mismo <i>porB</i> y ≥99% <i>tbpB</i> (n)	Mismo <i>tbpB</i> y ≥99% <i>porB</i> (n)
G5119 40 (11,11)	ST5119 (24)	-	ST2992 (15), ST7758 (1)
G1407 26 (7,22)	ST1407 (15)	-	ST3149 (3), ST4269 (3), ST8993 (2), ST3378 (1), ST3431 (1), ST5335 (1)
G1861 18 (5,00)	ST1861 (17)	-	ST2264 (1)

¹Porcentaje sobre el total de 360 aislados del estudio.

De los 359 aislados estudiados, 84 aislados (23,33% del total) fueron agrupados en genogrupos. El genogrupo G5119 fue el más predominante de los 3 genogrupos obtenidos, aunque solo cuenta con 3 ST diferentes. Por el contrario, G1407, que es el segundo genogrupo con mayor frecuencia, cuenta con un total de 7 ST diferentes.

4.5.2. Relación entre secuenciotipos y las características demográficas del paciente

Se analizó la asociación entre los genogrupos y ST más prevalentes con la edad y sexo de los pacientes. Se observó el número y porcentaje de pacientes masculinos y femeninos presentes en cada genogrupo y ST, además de la media y rango de edad (en años) de dichos pacientes. Estos datos se presentan en la Tabla 17. Para analizar la relación entre los ST/genogrupos y la edad se categorizó la edad de los pacientes en 0-24 años, 25-34 años, 35-44 años y ≥ 45 años. Se calculó el OR y el IC del 95% y se realizó la prueba del χ^2 de Pearson para observar la significancia de la asociación, o el test exacto de Fisher dependiendo del caso.

No se observó asociación alguna entre el sexo de pacientes y G5119 ($p = 0,959$), G1407 ($p = 0,110$) y ST5441 ($p = 0,435$). Se observó que G1861 y ST4186 son menos comunes en hombres (OR de G1861 = 0,192, IC 95% 0,069-0,539, $p = 0,001$, OR de ST4186 = 0,447, IC 95% 0,210-0,950, $p = 0,033$). Todos los aislados pertenecientes a ST5624 corresponden a hombres y se observó una asociación significativa ($p = 0,023$).

Tabla 17: Características de los pacientes de infección gonocócica representados en los ST y genogrupos predominantes.

ST/Genogrupo	Género de los pacientes		Edad (años)	
	Pacientes hombres, n (%)	Pacientes mujeres, n (%)	Media	Rango
G5119	28 (82,4)	6 (17,6)	38,2	18-60
G1407	13 (68,4)	6 (31,6)	36,3	22-70
G1861	8 (50)	8 (50)	23,1	17-30
ST4186	28 (70)	12 (30)	36,7	21-81
ST5624	22 (100)	0 (0)	32,2	20-46
ST5441	10 (90,9)	1 (9,1)	31,2	16-47

El genogrupo G5119 fue menos común en el rango de edad de 0-24 años (OR de G5119 = 0,140, IC 95% 0,019-1,059, $p = 0,028$) y G1861 fue más común en ese mismo rango (OR = 6,527, IC 95% 2,294-18,573, $p < 0,001$). Ninguno de los aislados de G1861 se encontraban en los rangos 35-44 años y ≥ 45 años, por lo que se observó una asociación negativa (35-44 años: $p = 0,011$, ≥ 45 años: $p = 0,048$). No se observaron más asociaciones estadísticamente significativas entre un genogrupo o ST y un determinado rango de edad ($p > 0,05$ en todos los casos).

4.5.3. Relación entre secuenciotipos/genogrupos y resistencia antimicrobiana

Siguiendo la metodología de Chisholm *et al.* (2013) (271), se analizó la asociación entre los genogrupos observados y la resistencia antimicrobiana obtenida. También se realizó este análisis con los ST más prevalentes ($n \geq 10$) que no forman parte de ninguno de los genogrupos observados.

- **G5119:** Ninguno de los 40 aislados de este genogrupo mostró CMI cercanas al punto de corte de resistencia para cefixima y ceftriaxona (CMI $\geq 0,060$ mg/L). Ningún aislado fue resistente a cefepime, cefuroxima y penicilina, aunque la mayoría mostraron sensibilidad intermedia a penicilina. Solo un aislado fue resistente a ciprofloxacino, observándose una asociación muy baja entre G5119 y resistencia a ciprofloxacino (OR = 0,027, IC 95% 0,004-0,202, $p < 0,001$, prueba

χ^2 de Pearson). Sin embargo, 32 aislados mostraron resistencia a tetraciclina y 34 a azitromicina, observándose una alta asociación entre este genogrupo y la resistencia a estos dos antimicrobianos (OR de tetraciclina = 4,146, IC 95% 1,845-9,315, $p < 0,001$, OR de azitromicina = 14,866, IC 95% 6,004-36,810, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). Solo 3 aislados fueron productores de β -lactamasa, por lo que no se observó relación entre G5119 y producción de β -lactamasa ($p = 0,708$, prueba χ^2 de Pearson).

- **G1407:** 17 de los 26 aislados de este genogrupo mostraron CMI cercanas al punto de corte de resistencia para ceftriaxona (CMI $\geq 0,060$ mg/L) y 6 aislados a cefixima, observándose una alta asociación entre G1407 y resistencia a cefixima y ceftriaxona (OR de ceftriaxona = 108,800, IC 95% 32,846-360,390, $p < 0,001$, OR de cefixima = 21,675, IC 95% 5,654-83,098, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). De hecho, el 77,3% de los aislados con CMI $\geq 0,060$ mg/L a ceftriaxona observados pertenecen a este genogrupo. 12 aislados fueron resistentes a cefepime y 24 a cefuroxima, observando una alta asociación (OR de cefepime = 49,371, IC 95% 15,276-159,567, $p < 0,001$, OR de cefuroxima = 307,636, IC 95% 64,438-1468,698, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). Todos los aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a ciprofloxacino, observando una asociación significativa ($p < 0,001$, test exacto de Fisher). 20 aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a tetraciclina y 18 a azitromicina, observando altas asociaciones entre G1407 y la resistencia a estos dos antimicrobianos (OR de tetraciclina = 3,221, IC 95% 1,258-8,252, $p = 0,011$, OR de azitromicina = 4,839, IC 95% 2,030-11,531, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). Solo 5 aislados fueron resistentes a penicilina y no se observó una asociación significativa ($p = 0,673$, prueba χ^2 de Pearson), aunque los restantes 21 aislados mostraron sensibilidad intermedia. Solo dos aislados eran productores de β -lactamasa y no se observó una asociación significativa entre G1407 y producción de β -lactamasa ($p = 0,751$, prueba χ^2 de Pearson).
- **G1861:** Ninguno de los 18 aislados de este genogrupo presentó CMI cercanas al punto de corte (CMI $\geq 0,060$ mg/L) de cefixima y ceftriaxona. Tampoco fueron resistentes a cefepime, y solo un aislado fue resistente a cefuroxima, por lo que no se ha observado asociación alguna entre este genogrupo y la resistencia a cefuroxima ($p = 0,449$, prueba χ^2 de Pearson). Todos los aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a ciprofloxacino, observando una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,001$, test exacto de Fisher). 11 aislados fueron resistentes a tetraciclina, aunque no se observó una asociación significativa ($p = 0,477$, prueba χ^2 de Pearson). Solo 3 aislados mostraron

resistencia a penicilina y resistencia o sensibilidad intermedia a azitromicina, por lo que no se observaron asociaciones significativas (penicilina: $p = 0,966$, azitromicina: $p = 0,096$, prueba χ^2 de Pearson). Ninguno de los aislados fue productor de β -lactamasa.

- **ST4186:** Ninguno de los 51 aislados de este ST presentó CMI iguales o superiores a 0,060 mg/L a cefixima y ceftriaxona. Ningún aislado fue resistente a cefuroxima y cefepime. Tampoco fueron resistentes a penicilina, aunque todos los aislados (excepto uno) mostraron sensibilidad intermedia. Solo 2 aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a ciprofloxacino, por lo que no se observó asociación alguna entre la resistencia a ciprofloxacino y el ST4186 (OR = 0,041, IC 95% 0,010-0,171, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). 12 aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a tetraciclina y 10 a azitromicina, aunque no se observó relación entre la resistencia a estos antimicrobianos y el ST4186 (OR de tetraciclina = 0,218, IC 95% 0,109-0,434, $p < 0,001$, OR de azitromicina = 0,403, IC 95% 0,194-0,840, $p = 0,013$, prueba χ^2 de Pearson). 5 aislados fueron productores de β -lactamasa, aunque no se observó asociación ($p = 0,925$, prueba χ^2 de Pearson).
- **ST5624:** Ninguno de los 24 aislados de este ST presentaron CMI $\geq 0,060$ mg/L a cefixima y ceftriaxona. Ningún aislado fue resistente a cefuroxima y cefepime. Todos los aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a ciprofloxacino, por lo que se observó una asociación significativa ($p < 0,001$, test exacto de Fisher). 17 aislados fueron resistentes a penicilina, por 6 con sensibilidad intermedia y 1 sensible, observando una alta asociación entre la resistencia a penicilina y ST5624 (OR = 18,041, IC 95% 6,989-46,569, $p < 0,001$, prueba χ^2 de Pearson). 14 aislados mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a tetraciclina y 8 a azitromicina, aunque no se observó asociación (tetraciclina: $p = 0,585$, azitromicina: $p = 0,876$, prueba χ^2 de Pearson). Solo 1 aislado fue productor de β -lactamasa, aunque no se observó asociación ($p = 0,383$, prueba χ^2 de Pearson).
- **ST5441:** Ninguno de los 24 aislados de este ST presentaron CMI $\geq 0,060$ mg/L a cefixima y ceftriaxona. Ningún aislado fue resistente a cefuroxima y cefepime, y no mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a ciprofloxacino. Tampoco fueron resistentes a penicilina, aunque todos mostraron sensibilidad intermedia. Solo 1 aislado presentó resistencia o sensibilidad intermedia a tetraciclina, y 3 a azitromicina, pero no se observó asociación entre la resistencia a estos antimicrobianos y ST5441 (OR de tetraciclina = 0,068, IC 95% 0,009-0,533, $p = 0,001$, azitromicina: $p = 0,365$, prueba χ^2 de Pearson). Solo 1 aislado fue

productor de β -lactamasa, por lo que no se observó asociación entre ST5441 y la producción de β -lactamasa ($p = 0,858$, prueba χ^2 de Pearson).

Resumiendo, G5119 se encuentra asociado a la resistencia a azitromicina y tetraciclina. G1407 está relacionado con la resistencia a azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, cefepima y cefuroxima, y a la sensibilidad reducida a cefixima y ceftriaxona. G1861 se asocia a la resistencia a ciprofloxacino. ST5624 está asociado a la resistencia a ciprofloxacino y penicilina. ST4186 y ST5441 no están relacionados con la resistencia a ninguno de los antibióticos utilizados en el estudio. Todos los ST y genogrupos están asociados de alguna manera a la resistencia a penicilina, ya que solo el 1,67% de los aislados del estudio fueron sensibles a este antibiótico. Sin embargo, los aislados de ST5624 mostraron una mayor asociación a la resistencia a penicilina que el resto de ST. Por último, ningún genogrupo o ST está relacionado con la producción de β -lactamasa.

De acuerdo a Tribuddharat *et al.* (2017) (285), G1407 estaría relacionado a la MR, pues está formado por aislados resistentes a tres clases de antimicrobianos. Por el contrario, de acuerdo a Tapsall *et al.* (2009) (115), ninguno de ellos sería MR porque no son resistentes a cefixima, ceftriaxona o espectinomicina.

La Figura 10 muestra los ST representados por dos o más aislados de *N. gonorrhoeae* y presentes en dos o más casos en este trabajo que mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a uno o más antimicrobianos testados en este trabajo. En la Figura 10 se observan tres ST de interés: ST2958 mostró resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina, cefepima, cefuroxima, ciprofloxacino y tetraciclina, además de CMI de 0,060 mg/L a cefixima y ceftriaxona. ST2400 y ST4995 mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina. Ninguno de estos tres ST cumple los criterios utilizados por Chisholm *et al.* (2013) (271) (formar parte de un genogrupo o contar con ≥ 10 aislados en el estudio), por lo que no se realizó el análisis estadístico de sus resultados. Sin embargo, no se puede descartar que estén relacionados con la resistencia a varios antimicrobianos.

Por último, el aislado que presentó alta resistencia a azitromicina (CMI > 256 mg/L mediante la técnica E-test) no pudo ser descrito mediante la base de datos de NG-MAST. Los alelos que corresponden a este aislado son *porB* 7629 y *tbpB* 4.

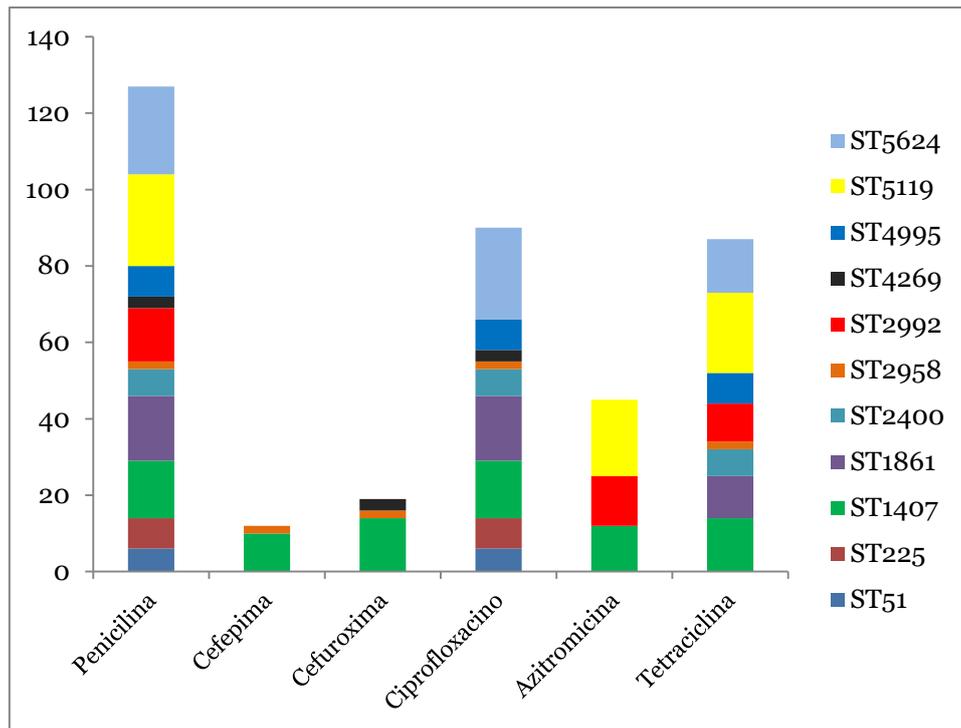


Figura 10: Distribución de los ST representados por los aislados de *N. gonorrhoeae* resistentes o con sensibilidad intermedia a 2 o más antimicrobianos.

5. DISCUSIÓN

5.1. Incidencia de la infección gonocócica

La incidencia registrada en los años 2014 (45,59 casos por 100.000 habitantes) y 2015 (40,66 casos por 100.000 habitantes) contrasta con los resultados observados por otro estudio de nuestro Servicio que analizó los casos de infección gonocócica correspondientes al periodo 2011-2013 en las mismas condiciones al estudio que presentamos. En ese estudio se observó una tendencia descendente de la infección gonocócica, de los 38 casos por 100.000 habitantes en 2011 a 24 casos por 100.000 habitantes en 2013 (286), pero en el actual estudio se observa una tendencia ascendente de 2013 a 2014, puesto que la incidencia de 2014 es un 89,96% superior a la de 2013. Cabe resaltar que durante este periodo de estudio no se han producido cambios en el sistema de trabajo de nuestro Servicio que justifiquen este cambio de tendencia.

La incidencia registrada en este trabajo es muy superior a la media registrada en España, con una incidencia de 9,82 casos por 100.000 habitantes reportada por RENAVE en el año 2014 (15). Asimismo, continúa la tendencia ascendente que se ha observado en España desde el año 2002 (287). También es superior a la media registrada por el ECDC en el año 2014 en la UE y AEE de 20 casos por 100.000 habitantes, aunque inferior a los 60 casos por 100.000 habitantes reportados en el Reino Unido en el mismo estudio (14). Es importante destacar que, desde que se realiza el estudio anual del ECDC, el Reino Unido es el país que registra una mayor incidencia de infección gonocócica, y se ha incrementado considerablemente desde el año 2008 (30,8 casos por 100.000 habitantes) (288) hasta 2014 (60 casos por 100.000 habitantes).

La alta tasa de incidencia encontrada en nuestro medio puede deberse a que el área sanitaria “Comarca Bilbao” cuenta con dos consultas de ITS altamente organizadas y experimentadas, las cuales llevan a cabo la detección clínica de nuevos casos y el seguimiento de los pacientes y sus contactos sexuales. Estas consultas de ITS tienen un estrecho contacto con el laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto, lo que implica que haya una excelente conexión entre los casos, las muestras y el diagnóstico microbiológico. Estos datos sugieren que la infección gonocócica puede estar infradiagnosticada y/o infranotificada en muchas zonas de España, tal y como indican *Vall et al.* (2004) (289), donde se relaciona este hecho con la escasez de recursos destinados a la detección de ITS en España.

En cambio, al comparar nuestros datos con los registrados por el CDC en EEUU durante el mismo periodo de tiempo, observamos que nuestra incidencia de infección gonocócica es mucho más baja, ya que el CDC publica 110,7 casos por 100.000 habitantes

en 2014 y 123,0 casos por 100.000 habitantes en 2015 (13). De acuerdo al CDC, el aumento en la incidencia de la infección gonocócica detectado en EEUU puede deberse a varios factores como las modificaciones en las prácticas de cribado de ITS (pruebas de cribado para *C. trachomatis* que también detectan infecciones de *N. gonorrhoeae* o el aumento de pruebas de cribado de localizaciones anatómicas extragenitales), el uso cada vez más frecuente de TAAAN para el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* y modificaciones en el reporte de los casos de infección gonocócica (13). Otro factor al que el CDC hace referencia es la presencia de portadores asintomáticos, sobre todo mujeres, que suponen un infradiagnóstico de la infección gonocócica. Por esta razón el CDC recomienda el uso de barreras de protección en las relaciones sexuales, y también recomienda que se realice un cribado anual para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* en mujeres menores de 25 años sexualmente activas (13). Otros factores que pueden afectar al aumento de la incidencia de la gonorrea (al igual que para el resto de ITS) entre jóvenes son las dificultades para acceder a servicios de control y prevención de ITS de calidad, debido a los largos tiempos de espera, conflicto entre los horarios de clínicas y colegio/trabajo, métodos de recogida de muestras y preocupaciones sobre la confidencialidad (por ejemplo, el ponerse en contacto con padres o tutores) (13).

5.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

El nivel de resistencia y sensibilidad intermedia a penicilina fue del 98,33%. Este porcentaje de resistencia es similar al observado en el estudio del periodo 2011-2013 realizado de nuestro Servicio (286) y superior a la publicada en otros estudios en nuestro país, por ejemplo el estudio realizado en Barcelona en el cual observan un 68% de resistencia y sensibilidad intermedia (290) y el publicado en Almería con un 61,2% (291). El porcentaje de resistencia y sensibilidad intermedia a penicilina observado en nuestro estudio es similar al de otros estudios que han observado niveles cercanos al 90% en Asia y América (285,292–294), aunque un estudio que analiza aislados de 11 países de Latinoamérica y Caribe en el periodo 2000-2009 observó un nivel de resistencia a penicilina mucho menor (28% de media de resistencia en el conjunto de países del estudio), si bien los resultados varían considerablemente entre distintos países y años (223).

Se han observado 34 aislados productoras de β -lactamasa plasmídica (9,44%), 32 de ellos resistentes a penicilina y 2 con sensibilidad intermedia. El porcentaje de producción de β -lactamasas observado es similar al detectado en el estudio de años anteriores de nuestro Servicio, en el que se observó un 8,7% (286). El 73,5% de los aislados productores de β -lactamasas de nuestro estudio han producido halos de inhibición de 19 mm de diámetro o menos, lo que coincide con el CLSI, que asegura que

los gonococos que producen halos de 19 mm o menos son probablemente productores de β -lactamasas (254). Los resultados de nuestro estudio apoyan esa declaración pero las pruebas de detección de β -lactamasas siguen siendo necesarias porque un alto número de aislados productores de β -lactamasas han producido halos de más de 19 mm. El porcentaje de productores de β -lactamasas con halos de menos de 19 mm fue menor en el estudio anterior de nuestro Servicio (53,1%) (286).

El nivel de resistencia a ciprofloxacino observado en nuestro estudio fue del 46,11%, inferior al detectado en nuestro Servicio en el periodo 2011-2013 (286), quizás debido a la exclusión de este antimicrobiano como tratamiento de primera línea de la infección gonocócica. Los porcentajes de resistencia observados para ciprofloxacino en Barcelona (290) y Almería (291) son 53% y 64,6% respectivamente, algo superiores al 46,11% observado en nuestro estudio, aunque Serra-Pladevall *et al.* (2016) advierten un porcentaje de resistencia a ciprofloxacino inferior (49,2%) en un estudio de 2013 en Barcelona (295). Los estudios de Asia muestran niveles de resistencia y sensibilidad intermedia a ciprofloxacino superiores al 80% (285,292,293,296), porcentajes muy superiores a los de este estudio (46,11%), pero los estudios americanos muestran porcentajes menores a los de este estudio, aunque con grandes diferencias entre distintos países (223,294).

El nivel de resistencia a tetraciclina observado en nuestro estudio fue del 53,89%, inferior al detectado en nuestro Servicio en el periodo 2011-2013 (286), quizás debido a la exclusión de este antimicrobiano como tratamiento de primera línea de la infección gonocócica. Cobo *et al.* (2016) publican un 70,3% de resistencia y sensibilidad intermedia a tetraciclina en Almería (291), superior al 53,89% detectado en este estudio. Sin embargo, se debe puntualizar que Cobo *et al.* (2016) utilizaron la técnica E-test para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Se han detectado niveles de resistencia a tetraciclina similares a los de nuestro estudio en Latinoamérica (223), Brasil (294) y la India (293), pero en Pakistán (292) y Tailandia (285) se han detectado niveles de resistencia y sensibilidad intermedia entre el 90% y 100%, superiores a los de nuestro estudio.

Los altos porcentajes de resistencia y sensibilidad intermedia observados en este estudio avalan que no se debe utilizar penicilina, tetraciclina y ciprofloxacino como tratamiento de primera línea. En efecto, algunas organizaciones como la OMS, el CDC y el ECDC no recomiendan el uso de penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina como tratamiento de primera línea contra la infección gonocócica hoy en día (31).

El 100% de los aislados se han mostrado sensibles a espectinomicina, es decir, no se ha detectado ningún caso de resistencia a este antimicrobiano. El resultado es equivalente al obtenido por el estudio anterior realizado en nuestro Servicio (99,7% de sensibilidad a espectinomicina) y a los estudios españoles consultados (290,291), aunque Serra-Pladevall *et al.* (2013) publicaron un aislado de *N. gonorrhoeae* resistente (290). También es similar a los estudios asiáticos (285,292,293) y americanos (223,294) consultados, aunque Starnino *et al.* (2012) observaron en Latinoamérica dos aislados con sensibilidad intermedia, sobre un total de 7.664 aislados (223). Pese a la alta eficacia observada por este antimicrobiano *in vitro*, es económicamente costoso, no está disponible en muchos países y es poco eficaz contra infecciones faríngeas (138). Sin embargo, se ha mostrado efectivo en casos de infecciones gonocócicas urogenitales y anorrectales (138), por lo que el CDC recomienda su uso como terapia alternativa, por ejemplo en casos de alergia a antimicrobianos β -lactámicos (158). Los bajos niveles de resistencia observados en nuestro estudio y en muchos otros refuerzan estas recomendaciones.

Dado que, ninguna guía terapéutica ha establecido puntos de corte para gentamicina de forma oficial, nos guiamos por los puntos de corte publicados por Bala *et al.* (2016) para la técnica de difusión en agar disco-placa, según los cuáles aquellos aislados con diámetro de halo de inhibición de ≥ 16 mm son considerados sensibles, 13-15 mm sensibilidad intermedia y ≤ 12 mm resistentes (279). Según estos criterios, el 100% de los aislados de nuestro estudio se mostraron sensibles a gentamicina. El estudio de nuestro Servicio del periodo 2011-2013 propuso, basándose en los resultados obtenidos y en los puntos de corte basados en la CMI (R ≥ 32 mg/L, SI 8-16 mg/L, S ≤ 4 mg/L), que los aislados con diámetro de halo de inhibición de ≥ 29 mm son considerados sensibles, 18-28 sensibilidad intermedia y ≤ 17 mm resistentes (286). De acuerdo a estos puntos de corte, en nuestro estudio se observaron un 29,7% de aislados con sensibilidad intermedia y un 70,3% sensibles. De acuerdo a los criterios de Bala *et al.* (2016) (279) el 100% de los aislados de nuestro estudio fueron sensibles, por lo que los puntos de corte propuestos por el anterior estudio de nuestro Servicio parecen más estrictos que los de Bala *et al.* (2016). Un estudio a nivel europeo del año 2009, utilizando los puntos de corte para gentamicina basados en la CMI (R ≥ 32 mg/L, SI 8-16 mg/L, S ≤ 4 mg/L) observó en 2011 un 17% de aislados sensibles a gentamicina y un 83% con sensibilidad intermedia, sin ningún aislado resistente, utilizando la técnica de dilución en agar disco-placa (229). En el mismo estudio también utilizaron la técnica E-test para evaluar la resistencia a gentamicina, logrando CMI menores en comparación a la dilución en agar. Esto podría explicar por qué otros estudios basados en la técnica E-test logran menores niveles de resistencia, como Starnino *et al.* (2012) en Latinoamérica (3% de resistencia) y Bala *et*

al. (2016) (23,5% I y 0,6% R) (223,279). Brown *et al.* (2010) observaron un 100% de sensibilidad a gentamicina en Malawi (África) mediante las técnicas de difusión en agar disco-placa y dilución en agar (228), pero solo interpretan los resultados mediante los puntos de corte basados en la CMI. La alta diferencia en los puntos de corte propuestos para gentamicina hasta la fecha hacen necesario que se establezcan unos puntos de corte de referencia basados en ensayos clínicos adecuados, de manera que cada laboratorio pueda establecer los puntos de corte del método utilizado basándose en los métodos de referencia. Los bajos niveles de resistencia a gentamicina observados en nuestro estudio y los estudios consultados sugieren que la gentamicina podría emplearse como terapia en el futuro, pero se debe realizar un mayor número de estudios para establecer unos puntos de corte óptimos y se debe buscar otras terapias alternativas.

El nivel de resistencia a azitromicina observado durante el periodo de estudio (2014-2015) mediante la técnica E-test (9,17% R y 27,50% I) es similar al detectado por algunos estudios de Brasil (294), Hungría (297) y Japón (171). Lebedzeu *et al.* (2015) también observaron una elevada resistencia en Bielorrusia, aunque ésta se reduce con los años, desde un 35% en 2010 y 2011 (resistencia más sensibilidad intermedia) a un 10% en 2013 (resistencia más SI) (298). Regnath *et al.* (2016) observaron un 5,5% de resistencia y 21% de sensibilidad intermedia en Alemania (299), y Starnino *et al.* (2012) observaron en Latinoamérica un 13% de resistencia en el periodo 2000-2009, con una tendencia ascendente (del 6% de resistencia en 2000 al 23% en 2009) (223). En España se observó un 4,3% de resistencia en Barcelona (295) y un 13,8% de resistencia en Almería (291). Por otro lado, dos estudios de Pakistán (292) e India (293) observaron niveles muy bajos de resistencia, entre 0-5%. El Euro-GASP analizó la resistencia a azitromicina del año 2014, observando un incremento del 5,4% en 2013 al 7,9% en 2014 (300). Sin embargo, los resultados varían considerablemente entre los 21 países europeos participantes, desde el 0% (Chipre, Estonia e Islandia) al 40% (Grecia).

La OMS indica que un tratamiento es considerado eficaz si logra curar al menos un 95% de las infecciones (11). De acuerdo a la OMS, y teniendo en cuenta los resultados logrados en este estudio, la azitromicina no debería ser considerada como una opción de tratamiento en monoterapia en nuestro entorno. Sin embargo, el uso de azitromicina en terapia dual junto a ceftriaxona está recomendado por el CDC, el ECDC y la OMS, los cuales recomiendan la terapia dual de 250 mg de ceftriaxona intramuscular y 1 g de azitromicina oral, o la terapia dual de 400 mg de cefixima y 1 g de azitromicina oral como terapia alternativa (156-158).

Respecto a la evolución de la resistencia a azitromicina, se ha observado una reducción significativa en el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia y resistencia (χ^2 , $p = 0,000$) del año 2014 (16,3% R y 41,1% I) al año 2015 (1,2% R y 17,1% I). El Euro-GASP también detectó una tendencia descendente en la resistencia a azitromicina entre 2008 (13% de resistencia) y 2012 (4,5% de resistencia) (156), aunque menos agresiva que el descenso observado en nuestro estudio, del 16,3% de resistencia en 2014 al 1,2% en 2015. Los resultados obtenidos en años anteriores en nuestro Servicio muestran un aumento en el porcentaje de resistencia desde el año 2011 al año 2014 (286). Algunas razones que podrían justificar este aumento pueden ser su amplio uso para tratar las infecciones respiratorias y las ITS causadas por *C. trachomatis* y algunas de sus características como su larga vida media, su prolongado efecto postantibiótico, etc. Se ha observado una reducción estadísticamente significativa (Mann Whitney, $p = 0,000$) en la CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina desde el año 2014 (0,38 mg/L y 0,75 mg/L respectivamente) al año 2015 (0,19 mg/L y 0,38 mg/L respectivamente). La CMI₅₀ y CMI₉₀ del periodo de estudio (2014-2015) son similares a las observadas en Brasil (0,125 mg/L y 0,38 mg/L) (294) y Bielorrusia (0,19 mg/L y 0,38 mg/L) (298). La resistencia a azitromicina observada mediante difusión en agar disco-placa, y utilizando los criterios de interpretación establecidos por BSAC, es del 3,06%.

La resistencia observada es considerablemente menor a la observada mediante E-test y es similar a algunos estudios consultados que utilizan la misma técnica (285,290,292). Sin embargo, varios estudios recomiendan el uso de técnicas basadas en la CMI sobre la difusión en agar disco-placa cuando estas técnicas están disponibles, de modo que los resultados logrados mediante el E-test han sido los utilizados para sacar conclusiones en este estudio. Se ha observado un aislado con resistencia de alto nivel a azitromicina (CMI > 256 mg/L), el primero en nuestro Servicio. El Euro-GASP detectó casos de resistencia de alto nivel en 2006 (1 aislado en Escocia), 2007 (4 aislados en Escocia), 2011 (1 aislado en Italia y otro en Irlanda), 2012 (1 aislado en Irlanda y 2 en Suecia), 2013 (1 aislado en Irlanda) y 2014 (1 aislado en Italia) (300). Países como Suecia, China y Australia han reportado casos de resistencia de alto nivel desde el año 2011 (150,153,301).

El 95,28% de los aislados se han mostrado sensibles a cefepime y el 89,72% a cefuroxima. La sensibilidad observada en los aislados obtenidos durante el periodo 2011-2013 en nuestro Servicio fue semejante, de un 92% a cefepime y 78% a cefuroxima (286). Estos resultados son similares a los de algunos estudios asiáticos que han llegado a reportar sensibilidades del 100% (285,302-304). Estos niveles de sensibilidad registrados sugieren que cefuroxima y cefepime podrían suponer una alternativa en el

tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas, aunque no es posible conocer el significado clínico de estos datos.

Respecto a la eritromicina, no es utilizada hoy en día como terapia antimicrobiana de la infección gonocócica porque no resulta suficientemente eficaz debido a que *N. gonorrhoeae* ha adquirido diversos mecanismos de resistencia contra este antimicrobiano y se han observado varios casos de tratamientos fallidos con eritromicina (98). Sin embargo, puede ser utilizado *in vitro* con fines epidemiológicos, para predecir la respuesta a azitromicina, ya que se ha observado una excelente correlación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en agar disco-placa para ambos antimicrobianos. Los resultados obtenidos por nuestro Servicio durante el periodo 2011-2013 también mostraron una excelente correlación entre ambos antimicrobianos (286).

Ninguno de los aislados estudiados mostró resistencia a cefixima y ceftriaxona, un resultado igual al observado en este Servicio en años anteriores (2011-2013) (286), aunque en este período se han observado 3 aislados con sensibilidad disminuida (0,83%). Por el contrario, otros estudios españoles han observado aislados resistentes a ambos antimicrobianos, aunque los porcentajes de resistencia varían dependiendo de los criterios de interpretación que se empleen, pues CLSI establece unos puntos de corte superiores ($R > 0,25$ mg/L para cefixima y ceftriaxona) a los de EUCAST ($R > 0,125$ mg/L a cefixima y ceftriaxona). Serra-Pladevall *et al.* (2013) en Barcelona y Cobo *et al.* (2016) en Almería observan mayores niveles de resistencia basándose en los puntos de corte de EUCAST en comparación a los de CLSI. Serra-Pladevall *et al.* (2013) obtuvieron un 1% de resistencia y 3% de sensibilidad disminuida basándose en los criterios de CLSI y un 1% de resistencia y 10% de sensibilidad disminuida basándose en EUCAST (290), mientras Cobo *et al.* (2016) observaron un 1,5% de resistencia a ceftriaxona y cefixima basándose en CLSI y 4,6% y 6,1% de resistencia basándose en EUCAST (291). En un estudio posterior, Serra-Pladevall *et al.* (2016) advirtieron un 8,2% de resistencia a cefixima y 0,6% a ceftriaxona, basándose exclusivamente en los criterios de EUCAST (295). En nuestro caso tanto siguiendo los criterios de CLSI como de EUCAST no se obtiene ninguna cepa resistente a cefixima o a ceftriaxona. Esta situación hace necesario la obtención de un consenso que establezca unos puntos de corte únicos que facilite la comparación entre los diferentes estudios.

Los resultados publicados por Euro-GASP en 2014 muestran un 2% de resistencia a cefixima, inferior al 4,7% de 2013. 11 de los 21 países participantes en el estudio de Euro-GASP no reportaron casos de resistencia a cefixima y todos los países del estudio excepto Bélgica, Países Bajos, Italia y Noruega detectaron una reducción en la resistencia

a cefixima con respecto a 2013 (300). España observó la mayor reducción en la resistencia, del 15,3% en 2013 al 0% en 2014, aunque argumentan que esta reducción en la resistencia a cefixima podría deberse al uso de la técnica E-test en 2014, mientras que en 2013 se utilizó la dilución en agar (300). Tan solo 5 aislados fueron resistentes a ceftriaxona (3 de Grecia, 1 de Alemania y 1 de Noruega), resultado inferior a los 7 aislados detectados en 2013. Lebedzeu *et al.* (2015) también observaron niveles muy bajos de resistencia a cefixima y ceftriaxona (0,5% y 0% respectivamente) en Bielorrusia (298), al igual que Regnath *et al.* (2016) en Alemania (299). Los estudios asiáticos consultados obtienen niveles muy bajos (o no obtienen ninguna cepa resistente) de resistencia, como el 0% a cefixima y ceftriaxona observado en Tailandia (285), aunque otros han obtenido resistencias cercanas al 5% (293,296) e incluso cercanas al 10% (305). El “Gonococcal Isolate Surveillance Project” (GISP), encargado de analizar las tendencias de sensibilidad antimicrobiana en EEUU, observó un 0,4% de resistencia a cefixima en 2013 y 0,8% en 2014. También observaron un 0,1% de resistencia a ceftriaxona en 2013 y 0,2% en 2014 (306). Otros estudios americanos observaron resistencias cercanas a 0% para ambos antimicrobianos (223,294). Sin embargo, varios de los estudios, sobre todo los americanos y asiáticos, interpretaron sus resultados basándose en los puntos de corte establecidos por CLSI. Como los puntos de corte para cefixima y ceftriaxona establecidos por CLSI y EUCAST son diferentes ($R > 0,25$ mg/L para ambos antimicrobianos según CLSI y $R > 0,125$ mg/L según EUCAST), los estudios que se guiaban por los puntos de corte establecidos por CLSI podrían mostrar mayores niveles de resistencia a cefixima y ceftriaxona si se guiasen por los puntos de corte establecidos por EUCAST.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ observadas para cefixima y ceftriaxona durante el periodo de estudio (2014-2015) son de 0,004 mg/L y 0,15 mg/L para cefixima y 0,004 mg/L y 0,030 mg/L para ceftriaxona. De 2014 a 2015 se ha observado un incremento en la CMI₉₀ de cefixima, de 0,015 mg/L a 0,030 mg/L, y una reducción de la CMI₉₀ de ceftriaxona, de 0,030 mg/L a 0,015 mg/L. La CMI₅₀ de cefixima se ha mantenido en 0,004 mg/L durante los dos años, pero la CMI₅₀ de ceftriaxona ha sufrido una reducción de 0,008 mg/L a 0,004 mg/L, aunque estadísticamente no significativa (Mann-Whitney, $p = 0,078$). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro Servicio en años anteriores (2011-2013) (286), la CMI₅₀ de ambos antimicrobianos se mantiene en el rango de 0,002-0,008 mg/L durante los cinco años (de 2011 a 2015). Las CMI₅₀ y CMI₉₀ observadas en nuestro estudio son considerablemente menores a las observadas en Barcelona en 2011, donde observaron CMI₅₀ de 0,016 mg/L y $< 0,016$ mg/L a cefixima y ceftriaxona respectivamente, y CMI₉₀ de 0,125 mg/L a cefixima y 0,064 mg/L a ceftriaxona (290). Teniendo en cuenta el estudio anterior de nuestro Servicio en el periodo 2011-2013 (286), se observa una tendencia ascendente de la CMI₉₀ de cefixima

(de 0,008 mg/L en 2012 a 0,030 mg/L en 2015) y una tendencia descendente de la CMI₉₀ de ceftriaxona (de 0,06 mg/L en 2011 a 0,015 mg/L en 2015). La tendencia descendente observada para ceftriaxona es similar a la observada por el Euro-GASP desde el año 2010 (8,7% de resistencia a CES) al año 2014 (2,0% de resistencia a CES), con excepción del año 2013. También se han detectado tendencias descendentes similares en EEUU (306), Canadá (307), Rusia (146), China (308), Región Sureste de la OMS (309) y Europa (310–312).

Aunque no se han observado aislados resistentes a cefixima y ceftriaxona, de 2014 a 2015 se ha observado una reducción de aislados altamente sensibles (CMI \leq 0,002 mg/L) y un incremento en los aislados con CMI cercanos al punto de corte (CMI \geq 0,06 mg/L) establecido por EUCAST (R > 0,125 mg/L), aunque este incremento es estadísticamente no significativo. Los resultados mostrados por Euro-GASP registraron la misma tendencia en el año 2013, pero en 2014 observaron una reducción en los aislados con CMI cercanas al punto de corte establecido por EUCAST (156). En nuestro estudio también se observaron 3 aislados con CMI de 0,125 mg/L a ceftriaxona, por lo que estos aislados son considerados como cepas con sensibilidad disminuida a ceftriaxona de acuerdo a la OMS (220). Estos 3 aislados corresponden al año 2014, y no se observó ninguno en 2015. No se observó ningún aislado con sensibilidad disminuida a cefixima durante el periodo de estudio. Los niveles de sensibilidad a ceftriaxona observados en nuestro estudio avalan la indicación de este antimicrobiano como opción terapéutica en la infección gonocócica, tal y como recomiendan la mayoría de las guías y organizaciones como la OMS, el Euro-GASP y el CDC, los cuales recomiendan la terapia dual de 250 mg de ceftriaxona y 1 g de azitromicina. Como terapia alternativa se recomienda la terapia dual de 400 mg de cefixima y 1 g de azitromicina (156–158) la cual puede ser una opción recomendable en nuestro entorno por la ausencia de resistencia a cefixima que se ha observado en nuestro estudio. Sin embargo, se debe mantener una estrecha vigilancia de la tendencia de las CMI en estos antimicrobianos, puesto que el uso sistemático de cefixima y/o ceftriaxona en el tratamiento de la gonorrea podría causar la aparición de aislados con sensibilidad disminuida e incluso resistencia.

Por último, no se han observado aislados con resistencia de alto nivel a cefixima y ceftriaxona en nuestro estudio, al igual que en el estudio del periodo 2011-2013 realizado en nuestro Servicio (286). En 2011 se detectó la primera cepa con resistencia de alto nivel a cefixima y ceftriaxona (CMI de 1,5 mg/L a ambos) en España, y una de las primeras en el mundo (170,313).

Respecto a los aislados MR, el número de aislados observados varía dependiendo de la definición que se aplique. Por ejemplo, Tribuddharat *et al.* (2017), consideran MR a aquel aislado resistente a al menos 3 clases de antibióticos (285), un requisito que cumplen 14 aislados (3,89%) de nuestro estudio, la mayoría de ellos resistentes a penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina. Sin embargo, Tapsall *et al.* (2009), consideran MR a aquel aislado resistente a al menos un antimicrobiano recomendado generalmente para el tratamiento de la infección gonocócica en monoterapia (CES y espectinomicina), además de resistente a al menos dos de los menos utilizados (penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, *etc.*) (115). De acuerdo a esta última definición, ninguno de los aislados de nuestro estudio es MR, pues ninguno es resistente a cefixima, ceftriaxona o espectinomicina. En el estudio realizado por nuestro Servicio en el período anterior (2011-2013) se observaron las mismas discrepancias, pues dependiendo de las fuentes consultadas el porcentaje de aislados MR variaba de 0,3% a 42,3% (286). Esta falta de unificación de criterios puede dificultar la comparación de resultados entre distintos laboratorios, por lo que consideramos que se debe normalizar la definición de cepas gonocócicas MR, utilizando una definición que se base en los antimicrobianos que se utilicen frecuentemente en el tratamiento de la gonorrea. Tapsall *et al.* (2009) describen la (XR), que consiste en la resistencia a al menos dos antibióticos recomendados generalmente para el tratamiento en monoterapia de la infección gonocócica (CES y espectinomicina), además de resistente a al menos tres de los menos utilizados (penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, *etc.*) (115). En nuestro estudio no encontramos ninguna cepa XR de acuerdo a esta definición.

En nuestro estudio se ha analizado la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* a un total de 10 antimicrobianos, incluidos ceftriaxona y azitromicina, los recomendados para el tratamiento de primera línea de la infección gonocócica. La detección de aislados con CMI elevadas ($CMI \geq 0,060$ mg/L) a cefixima y ceftriaxona y el aumento del nivel de resistencia a azitromicina observada en comparación al estudio del período 2011-2013 de nuestro Servicio (286) refuerza la alerta de la OMS, la cual asegura que en el futuro se podría producir una pandemia de cepas de *N. gonorrhoeae* XR, con graves consecuencias para la salud pública (12). En esta situación, estudios como el nuestro son necesarios para monitorizar la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* en todo el mundo. Sin embargo, la OMS alerta que menos de la mitad de los países del mundo han reportado datos de sensibilidad antimicrobiana en los últimos cinco años. Los datos del GASP muestran un descenso en el número de países que reportan datos de sensibilidad antimicrobiana, desde 60 países en 2009 a 50 países en 2013 (12). Es necesario un aumento en los países participantes en el GASP y un mayor

esfuerzo en monitorizar la sensibilidad antimicrobiana como parte de la rutina en los Servicios ITS,

5.3. Comparación de técnicas de sensibilidad antimicrobiana

Se ha medido la correlación categórica entre las técnicas E-test y difusión en agar disco-placa para azitromicina. La correlación categórica observada es relativamente alta (V de Cramer = 0,559, $p = 0,000$) de acuerdo a la escala publicada por Rea y Parker (2004) (43). La correlación cuantitativa observada es negativa y muy alta ($r_s = -0,734$, $p = 0,000$) de acuerdo a la escala publicada por Hopkins (2000) (282). La correlación categórica observada en nuestro estudio es menor a la correlación cuantitativa observada. Esta diferencia puede deberse a que el BSAC, cuyos puntos de corte han sido utilizados para interpretar los resultados logrados mediante la técnica de difusión en agar disco-placa, solo clasifica los aislados en dos categorías (sensibles y resistentes), mientras que EUCAST, cuyos puntos de corte han sido utilizados para interpretar los resultados logrados mediante la técnica E-test, utiliza tres categorías (sensible, sensibilidad intermedia y resistencia). De este modo, 99 aislados (el 27,50%) clasificados como sensibles mediante la difusión en agar disco-placa han sido clasificados como sensibilidad intermedia mediante E-test. Si BSAC y EUCAST utilizaran el mismo número de categorías, quizás se habría observado una mejor distribución de los resultados, logrando así una mayor correlación categórica. Por lo tanto, parece necesario el establecimiento de un criterio unificado para clasificar la sensibilidad a un antimicrobiano independientemente de la técnica que se utilice, facilitando así la comparación de distintas técnicas. Por otro lado, la correlación observada entre la difusión en agar disco-placa y E-test, a pesar de ser alta, es menor a la observada en años anteriores en nuestro Servicio, en los que se observó una relación perfecta (286), aunque en ese periodo de estudio (2011-2013) se utilizaron los puntos de corte propuestos por Serra-Pladevall *et al.* (2013) para la difusión en agar disco-placa. Dichos puntos de corte (resistente menor a 24 mm, sensibilidad intermedia entre 24 mm y 26 mm, y sensible mayor a 27 mm) son más estrictos que los establecidos por BSAC (290), y basándonos en ellos observamos una correlación menor (V de Cramer = 0,336, $p = 0,000$) que la obtenida con los puntos de corte establecidos por BSAC en el periodo de estudio 2014-2015. Teniendo en cuenta estos resultados, recomendamos el uso de la difusión en agar disco-placa de forma rutinaria para la obtención de la sensibilidad a azitromicina por su sencillez y rentabilidad económica, pero para los casos en los que se logren diámetros cercanos al punto de corte de resistencia, se debe utilizar una técnica basada en la CMI, como el E-test, para lograr un resultado más detallado.

Se ha llevado a cabo el método de regresión lineal para analizar la correlación cuantitativa entre la difusión en agar disco-placa y dilución en agar para cefixima y ceftriaxona. La correlación observada es negativa y moderada para cefixima ($r_s = -0,467$, $p = 0,000$) y ceftriaxona ($r_s = -0,419$, $p = 0,000$). Estas correlaciones son menores a las observadas en el período anterior en nuestro Servicio, en el que se observaron correlaciones altas entre ambos antimicrobianos (286). Sin embargo, la correlación categórica observada es del 100%, ya que todos los aislados son sensibles a cefixima y ceftriaxona mediante las dos técnicas. Estos resultados sugieren que no existe una relación perfecta entre los mm de halo de inhibición y CMI medidos, aunque los aislados son clasificados en la misma categoría independientemente de la técnica empleada, por lo que cualquiera de estas técnicas puede ser utilizada para la obtención de la sensibilidad en las cepas de *N. gonorrhoeae*. La técnica de difusión en agar disco-placa es más sencilla y económicamente rentable, por lo que es idóneo para su uso en laboratorios de forma rutinaria, tanto para la realización de estudios de vigilancia epidemiológica como para el manejo del paciente. Al igual que con azitromicina, lo más recomendable es realizar el método de difusión en agar disco-placa para determinar la sensibilidad a *N. gonorrhoeae* de forma rutinaria, y la confirmación mediante la determinación de la CMI de ceftriaxona y cefixima en todas aquellas cepas cuyos resultados de diámetro de halo de inhibición estén en los límites de sensibilidad intermedia o resistencia, para lograr un resultado más detallado.

Para observar la correlación cuantitativa entre azitromicina y eritromicina mediante el método de difusión en agar disco-placa se ha realizado el método de regresión lineal. La correlación lograda es positiva y muy alta ($r_s = 0,762$, $p = 0,000$) de acuerdo a Hopkins (2000) (282). Aunque la eritromicina no es utilizada hoy en día en la terapia antimicrobiana contra la gonorrea debido a su baja eficacia, la alta correlación observada entre eritromicina y azitromicina mediante la difusión en agar disco-placa sugiere que este antimicrobiano puede ser empleado para predecir la respuesta a azitromicina.

5.4. Caracterización molecular de *Neisseria gonorrhoeae*

5.4.1. Prevalencia de secuenciotipos y genogrupos

Los ST de mayor frecuencia ($n \geq 10$) en este estudio han sido ST4186 (16,0%), ST5624 y ST5119 (7,5% cada uno), ST1861 (5,3%), ST2992 y ST1407 (4,7% cada uno) y ST5441 (4,1%). Algunos de estos ST, principalmente ST1407 y ST2992, también se han mostrado prevalentes en otros estudios realizados en España (290,291,295), incluido el estudio realizado en nuestro Servicio en el período anterior (286). El EURO-GASP analizó aislados de 21 países de UE/EEA, observando que el ST1407 es el ST

predominante en Austria, Bélgica, Italia, Países Bajos, Eslovenia, España y Reino Unido, mientras que el ST2992 lo es en Francia, Irlanda y Noruega (271). Además, de acuerdo al mismo estudio, el ST1407 tiene una prevalencia superior al 10% en Hungría, Noruega, Alemania, Grecia y Rumanía, y el ST2992 en Italia. Los principales ST observados en nuestro estudio son diferentes a los observados en América (314,315) y Asia (171,316,317), aunque el ST1407 está presente en todos los estudios, tanto en América como en Asia. Los resultados muestran que el ST1407 y el ST2992 están extendidos por todo el mundo, aunque el resto de ST difieren entre países. Esto nos indica que los distintos ST están asociados a ciertas áreas geográficas, aunque se requiere un mayor número de estudios para confirmar esta afirmación. Además, hemos encontrado 40 aislados cuyas secuencias no constan en la base de datos online de NG-MAST, lo que nos indica que podría tratarse de nuevos ST que aún no han sido descritos.

Se han obtenido un total de 71 ST diferentes, de los cuales un número elevado (n = 31) de aislados tienen un ST único, que no se repite en otros aislados. Esto puede estar asociado con la localización subóptima de los contactos sexuales de los pacientes, bien porque no se realiza un adecuado seguimiento de los contactos de los pacientes, o bien porque los contactos son diagnosticados y tratados en centros donde no se realiza el cultivo y consiguiente estudio de las cepas.

Se han observado tres genogrupos en nuestro estudio: G5119, G1407 y G1861. El G5119 es el más numeroso, es decir, el que está representado por un mayor número de aislados. Por otro lado el G1407 es el que está formado por un mayor número de ST diferentes, siete ST, mientras que el G5119 está formado por tres ST y G1861 por dos ST. El estudio realizado por Euro-GASP en el año 2013 observó siete genogrupos diferentes (271), aunque este estudio cuenta con un mayor número de aislados (n=1.066) que nuestro estudio (n=360) lo que justificaría estos resultados. En el estudio realizado por Euro-GASP, el G1407 también fue el formado por más ST diferentes y comparte 3 ST con el G1407 de nuestro estudio. El G1407 también ha sido identificado en estudios realizados en Europa (295,311,318,319), América (315) y Asia (317). Otros estudios no obtienen el G1407, aunque en la mayoría de ellos el ST1407 es uno de los ST más prevalentes (290,291,297,314,316,320).

La principal diferencia entre el estudio realizado por Euro-GASP en 2013 y nuestro estudio se encuentra en la clasificación del ST2992, ya que en nuestro estudio el ST2992 forma parte del G2992 y en el estudio de Euro-GASP forma parte del G5119. Esta diferencia en la clasificación radica en el criterio utilizado para agrupar los ST en genogrupos. Ese criterio consiste en nombrar a los genogrupos con el número del ST predominante de aquellos ST que forman el genogrupo. En nuestro estudio el ST5119 es

el ST predominante del grupo en el que se encuentra el ST2992, por lo que el genogrupo se denomina G5119. En el estudio de Euro-GASP, en cambio, el ST2992 es el ST predominante de su genogrupo, por lo que el genogrupo se denomina G2992.

En el estudio de Euro-GASP de 2013 no se detectó el ST5119, ni el ST1861, que en nuestro estudio forma parte del G1861. Pladevall *et al.* (2016) identifican el G2992 en Barcelona (295), al igual que el Euro-GASP en 2013 (271). Estos resultados nos alertan de la necesidad de establecer un criterio más preciso para nombrar los genogrupos, puesto que el criterio actual, que se basa en el ST más numeroso del grupo, puede dar lugar a que un mismo ST forme parte de diferentes genogrupos dependiendo de los resultados obtenidos, de forma que no se pueden comparar los diferentes estudios realizados. Por lo tanto, se debería establecer un sistema de agrupación que se base exclusivamente en la similitud de los ST, de modo que un genogrupo tenga siempre el mismo nombre, independientemente de la prevalencia de los ST de dicho grupo.

En algunos estudios europeos el ST2400 es muy frecuente y en todos ellos se agrupa en el G2400 (295,318,319). En nuestro entorno el ST2400 no es tan frecuente (n = 7) y no se puede agrupar en ningún genogrupo, el mismo resultado se obtiene en el estudio de Euro-GASP de 2013 (271). En nuestro entorno, en el período comprendido entre 2011 y 2013 el ST2400 fue más prevalente (286) que en el período actual estudiado (2014-2015) (14 aislados y 6,5% del total en el periodo 2011-2013, frente a los 7 aislados y 1,94% del total en el periodo 2014-2015).

5.4.2. Relación entre ST y resistencia antimicrobiana

No se ha observado relación entre un determinado ST y el género de los pacientes de infección gonocócica. El G1861 está altamente asociado a pacientes jóvenes, ya que todos los aislados fueron identificados en pacientes menores de 35 años.

Se ha estudiado la asociación entre los distintos genogrupos y la resistencia antimicrobiana de las cepas de *N. gonorrhoeae* analizadas con el fin de entender mejor la aparición y diseminación de cepas resistentes. También se ha analizado la asociación entre la resistencia y los ST altamente prevalentes (n ≥ 10) obtenidos que no forman parte de ninguno de los genogrupos observados, es decir, ST4186, ST5624 y ST5441.

El G1407 está asociado a la resistencia a azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, cefepima y cefuroxima, y a la sensibilidad disminuida a cefixima y ceftriaxona. Los estudios españoles (290,291,295) europeos (271,318), americanos (314,315,320) y asiáticos (171,317) consultados relacionan este genogrupo, o el ST1407, con la resistencia o sensibilidad disminuida a cefixima y ceftriaxona. Otros estudios relacionan el G1407 con la resistencia o altas CMI a azitromicina (271,290,316,319). De hecho, Shigemura *et*

al. (2015) en Japón y Belkacem *et al.* (2016) en Francia realizaron el secuenciotipado exclusivo de aislados de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina, y G1407 o ST1407 se encontraba entre los más prevalentes (316,319). Cobo *et al.* (2016) en Almería, el estudio Euro-GASP de 2013 y Shimuta *et al.* (2013) en Japón lo relacionan con la resistencia a ciprofloxacino (271,291,316), y Martin *et al.* (2013) en Canadá con la resistencia a penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina (315). El estudio realizado en el periodo anterior (2011-2013) en nuestro Servicio ya observó la relación entre ST1407 y resistencia a ciprofloxacino y altas CMI a cefixima y ceftriaxona, sin embargo, no se observó relación con la resistencia a azitromicina (286).

En nuestro trabajo, el G5119 se encuentra asociado a la resistencia a azitromicina y tetraciclina. Ninguno de los estudios consultados ha identificado este genogrupo, aunque ST2992, que en nuestro estudio forma parte del G5119, ha sido identificado en algunos de los estudios consultados (271,291,315). Cobo *et al.* (2016) identificaron un aislado con el ST2992 resistente a cefixima y azitromicina (291), y Martin *et al.* (2013) observaron una alta relación con la resistencia a azitromicina (315). Sin embargo, ni el estudio realizado por Euro-GASP en el año 2013 ni el realizado en el período 2011-2013 en nuestro laboratorio relacionaron el ST2992 con la resistencia a ningún antimicrobiano.

En nuestro estudio se identifica por primera vez el ST1861, el cual forma parte del G1861, el cual no había sido descrito hasta ahora en nuestro país. Además, hemos observado una alta asociación entre este genogrupo y la resistencia a ciprofloxacino, ya que el 100% (n = 18) de los aislados pertenecientes a este genogrupo fueron resistentes a ciprofloxacino.

Hemos encontrado relación entre el ST5624 y la resistencia a ciprofloxacino y penicilina, asociación que no se observa en otros estudios (271,286). Aunque la mayoría de los aislados del estudio mostraron resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina, se observó que los aislados con el ST5624 muestran una mayor asociación a la resistencia a penicilina que el resto de ST.

Los ST4186 y ST5441 no están asociados a la resistencia a ninguno de los antibióticos testados en este estudio. Esto mismo se observa en otros trabajos, aunque Shigemura *et al.* (2015) encuentran un aislado con el ST4186 resistente a azitromicina en Japón (316). Nuestro trabajo muestra un 19,61% de aislados del ST4186 resistentes (n = 1) y con sensibilidad intermedia (n = 9) a azitromicina, aunque esta asociación no fue significativa. El ST5441 observado en este trabajo es el primero descrito en nuestro país.

El ST2400 mostró resistencia a penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina. Los estudios consultados no relacionaron este ST con la resistencia a dichos antimicrobianos, aunque Pladevall *et al.* (2016) asociaron este ST con sensibilidad disminuida a cefixima y ceftriaxona en Barcelona (295). En nuestro estudio los aislados con el ST2400 no mostraron sensibilidad disminuida a cefixima y ceftriaxona, aunque sí CMI superiores a la media (cefixima = 0,014 mg/L, ceftriaxona = 0,020 mg/L). Brunner *et al.* (2016) detectaron un aislado con el ST2400 resistente a azitromicina en Hungría (297), y Belkacem *et al.* (2016) observaron que el G2400 es el tercer genogrupo más frecuentemente observado entre los aislados no sensibles a azitromicina en Francia (319). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha observado ningún aislado con el ST2400 resistente a azitromicina.

Estos resultados muestran que la tipificación molecular puede ser una herramienta eficaz para predecir la resistencia antimicrobiana y para estudiar la propagación de las cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos, lo que puede ayudar a desarrollar estrategias de tratamiento adecuadas. La relación de los diferentes ST y genogrupos con la resistencia antimicrobiana podría ayudar al tratamiento de aquellos pacientes a los que no se les han realizado los cultivos y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana apropiadas aunque la realización de estas pruebas sigue siendo imprescindible porque las relaciones observadas entre los ST y las cepas no son siempre estadísticamente significativas. Es necesaria la realización de más estudios de estas características para poder hacer estudios estadísticos de mayor fiabilidad.

5.5. Limitaciones del estudio

La principal limitación del presente estudio ha sido la ausencia de datos de los pacientes cuyos aislados se han analizado, como el motivo de diagnóstico, la presencia de otras coinfecciones como el VIH y la historia sexual de los pacientes y sus contactos. Esto nos hubiera permitido realizar un estudio epidemiológico más completo sobre los pacientes con infección gonocócica en nuestro entorno.

Otra importante limitación es la procedencia de los aislados del estudio, puesto que todos proceden del área Comarca Bilbao, por lo que los resultados obtenidos son exclusivamente representativos de esta área. Sin embargo, esta exclusividad tiene también un alto valor porque los resultados logrados pueden servir de referencia para actualizar las guías terapéuticas del área Comarca Bilbao.

Por otro lado, uno de los principales puntos fuertes del estudio es el gran tamaño muestral, difícil de obtener en muchos Servicios de Microbiología de nuestro país actualmente debido, entre otras razones, a la introducción de las técnicas de PCR para el diagnóstico de la infección gonocócica, que ha provocado que estos servicios utilicen exclusivamente esta técnica para realizar el diagnóstico sin llevar a cabo el cultivo y, como consecuencia, la ausencia de su posterior estudio de sensibilidad antimicrobiana y caracterización molecular.

6. CONCLUSIONES

1. Las tasas de infección gonocócica detectadas en este estudio son muy superiores a las tasas de España y Europa. Además, se observa un gran aumento de la incidencia del año 2013 a 2014, por lo que se rompe la tendencia descendente observada en el período anterior en nuestro Servicio.
2. Se han observado aislados con sensibilidad disminuida a ceftriaxona (0,83% del total) por primera vez en nuestro Servicio y las CMI de cefixima y ceftriaxona se han mostrado estables durante los dos años de estudio. Se ha observado una alta tasa de resistencia y sensibilidad intermedia a azitromicina, lo que afianza las recomendaciones recientes de no utilizar azitromicina como tratamiento de la infección gonocócica en monoterapia, aunque puede emplearse en la terapia dual junto con ceftriaxona.
3. No se ha observado resistencia a gentamicina y espectinomicina y las CMI de estos antimicrobianos se mantienen a lo largo del periodo de estudio, lo que nos indica que estos antimicrobianos podrían ser utilizados como terapia alternativa en casos de alergia a CES, casos de resistencia a cefixima y ceftriaxona o casos de fracaso terapéutico de la terapia dual de ceftriaxona y azitromicina.
4. Ante la emergencia en nuestro área de cepas de *N. gonorrhoeae* con CMI elevadas para ceftriaxona y cefixima, junto con resistencia simultánea a otros antimicrobianos, recomendamos la realización del estudio de sensibilidad antimicrobiana de rutina mediante el método de difusión en agar disco-placa a todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae*, que incluya todos los antimicrobianos indicados para su tratamiento, así como posibles alternativas, como la gentamicina, y la posterior determinación de la CMI en aquellas cepas de *N. gonorrhoeae* cuyos mm de halo se muestren cercanos a los puntos de corte, con el fin de detectar la aparición de cepas resistentes a estos antimicrobianos.
5. La caracterización molecular de los 319 aislamientos ha mostrado 71 ST y tres genogrupos diferentes circulando en el área sanitaria de Bilbao durante los años 2014 y 2015. Los ST más prevalentes identificados, en orden de mayor a menor frecuencia, son los ST 4186, 5624, 5119, 1861, 2992, 1407 y 5441. Los genogrupos detectados son el G5119, el G1407 y el G1861. La persistencia de estos ST a lo largo de los dos años estudiados nos indica que podría tratarse de clones altamente estables en nuestra área.
6. Este estudio describe la asociación de G1407 con la sensibilidad disminuida a cefixima y ceftriaxona, además de resistencia a azitromicina y otros antimicrobianos previamente utilizados como tratamiento de primera línea de la gonorrea. En este trabajo se describe por primera vez en Europa la asociación entre el G5119 y la resistencia a azitromicina.

7. Se observa la necesidad de establecer un nuevo criterio para el nombramiento de genogrupos que no se base en el ST más prevalente del grupo. En la actual situación, un mismo genogrupo puede recibir distintos nombres dependiendo de la zona geográfica donde se realice el estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Murray R, Rosenthal S, Pfaller M. Medical Microbiology. 7.^a ed. 1600 John F. Kennedy Blvd. Ste 1800 Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier Saunders; 2013.
2. Boulton C, Gray-Owen D. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4⁺ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2002;3(3):229-36.
3. Lee S, Ostrowski A, Gray-Owen D. CEACAM1 Dynamics during *Neisseria gonorrhoeae* Suppression of CD4⁺ T Lymphocyte Activation. *J Immunol.* 2008;180(10):6827-35.
4. Pantelic M, Chen I, Parker J, Zhang P, Grunert F, Chen T. Retinoic acid treated HL60 cells express CEACAM1 (CD66a) and phagocytose *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Immunol Med Mic.* 2004;42(2):261-6.
5. Elkins C, Carbonetti H, Varela A, Stirewalt D, Klapper G, Sparling P. Antibodies to N-terminal peptides of gonococcal porin are bactericidal when gonococcal lipopolysaccharide is not sialylated. *Mol Microbiol.* 1992;6(18):2617-28.
6. Blake M, Wetzler L, Gotschlich E, Rice P. Protein III structure, function, and genetics. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2(Suppl):60-3.
7. Ram S, Mcquillen D, Gulati S, Elkins C, Pangburn M, Rice P. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* 1998;188(4):671-80.
8. Jarva H, Ngampasutadol J, Ram S, Rice P, Villoutreix B, Blom A. Molecular characterization of the interaction between porins of *Neisseria gonorrhoeae* and C4b-binding protein. *J Immunol.* 2007;179(1):540-7.
9. Lewis L, Ram S, Prasad A, Gulati S, Getzlaff S, Blom A, et al. Defining targets for complement components C4b and C3b on the pathogenic neisseriae. *Infect Immun.* 2008;76(1):339-50.
10. Ngampasutadol J, Ram S, Gulati S, Agarwal S, Visintin A, Monks B, et al. Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion. *J Immunol.* 2008;180(5):3426-35.
11. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2012.

12. World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2015. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2016.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2015. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2016.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Gonorrhoea. [Internet]. Stockholm: ECDC; 2016 [citado el 02/04/2017]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Gonorrhoeae/Pages/Annualedpidemiologicalreport2016.aspx>. 2015.
15. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2014. RENAVE. 2016.
16. Murray R, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of clinical microbiology. 9.^a ed. Vol. 1. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
17. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, et al. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus [Internet]. World Health Organization; 2013 [citado 2 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/85343>
18. Beigi R, Wiesenfeld H. Pelvic inflammatory disease: new diagnostic criteria and treatment. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2003;30(4):777-93.
19. Balmelli C, Guntard H. Gonococcal tonsillar infection—a case report and literature review. *Infection.* 2003;31(5):362-5.
20. Rompalo A. Diagnosis and treatment of sexually acquired proctitis and proctocolitis: an update. *Clin Infect Dis.* 1999;28(Suppl.):84-90.
21. Mehrany K, Kist J, O'Connor W, DiGaudio D. Disseminated gonococemia. *Int J Dermatol.* 2003;42(3):208-9.
22. Ellison R, Curd J, Kohler P, Reller L, Judson F. Underlying complement deficiency in patients with disseminated gonococcal infection. *Sex Transm Dis.* 1987;14(4):201-4.
23. Bardin T. Gonococcal arthritis. *Best Pr Res Clin Rheumatol.* 2003;17(2):201-8.

24. Shetty A, Ribeiro D, Evans A, Linnane S. Gonococcal endocarditis: a rare complication of a common disease. *J Clin Pathol.* 2004;57(7):780-1.
25. Jacoby H, Mady B. Acute gonococcal sepsis in an HIV-infected woman. *Sex Transm Dis.* 1995;22(6):380-2.
26. Hegde V, Smith G, Choi J, Pagliarini S. A case of gonococcal keratoconjunctivitis mimicking orbital cellulitis. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005;83(4):511-2.
27. Dolter J, Wong J, Janda J. Association of *Neisseria cinerea* with ocular infections in paediatric patients. *J Infect.* 1998;36(1):49-52.
28. American Academy of Pediatrics Committee on Child Abuse and Neglect. Gonorrhoea in prepubertal children. *Pediatrics.* 1998;101(1 Pt 1):134-5.
29. Peter N, Clark L, Jaeger J. Fitz-Hugh-Curtis syndrome: a diagnosis to consider in women with right upper quadrant pain. *Cleve Clin J Med.* 2004;71(3):233-9.
30. UNAIDS. UNAIDS. world AIDS day report 2011. Geneva, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2011.
31. Unemo M, Shafter W. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century – past, evolution and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587-613.
32. Pilcher CD, Eron JJ, Vemazza PL, Battegay M, Harr T, Yerly S, et al. Sexual transmission during the incubation period of primary HIV infection. *JAMA.* 10 de octubre de 2001;286(14):1713-4.
33. Smit C, Geskus R, Walker S, Sabin C, Coutinho R, Porter K, et al. Effective therapy has altered the spectrum of cause-specific mortality following HIV seroconversion. *AIDS.* 2006;20(5):741-9.
34. Wada N, Jacobson LP, Cohen M, French A, Phair J, Muñoz A. Cause-specific life expectancies after 35 years of age for human immunodeficiency syndrome-infected and human immunodeficiency syndrome-negative individuals followed simultaneously in long-term cohort studies, 1984-2008. *Am J Epidemiol.* 15 de enero de 2013;177(2):116-25.
35. Samji H, Cescon A, Hogg RS, Modur SP, Althoff KN, Buchacz K, et al. Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada. *PloS One.* 2013;8(12):e81355.

36. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. AIDSinfo; 2016 [accedido 2 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv-guidelines/11/what-to-start>.
37. Farley TA, Cohen DA, Elkins W. Asymptomatic sexually transmitted diseases: the case for screening. *Prev Med.* abril de 2003;36(4):502-9.
38. Korenromp EL, Sudaryo MK, de Vlas SJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, et al. What proportion of episodes of gonorrhoea and chlamydia becomes symptomatic? *Int J STD AIDS.* febrero de 2002;13(2):91-101.
39. Wiesenfeld HC, Sweet RL, Ness RB, Krohn MA, Amortegui AJ, Hillier SL. Comparison of acute and subclinical pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis.* julio de 2005;32(7):400-5.
40. Berger RE, Alexander ER, Monda GD, Ansell J, McCormick G, Holmes KK. *Chlamydia trachomatis* as a cause of acute «idiopathic» epididymitis. *N Engl J Med.* 9 de febrero de 1978;298(6):301-4.
41. Barry PM, Kent CK, Philip SS, Klausner JD. Results of a program to test women for rectal chlamydia and gonorrhoea. *Obstet Gynecol.* abril de 2010;115(4):753-9.
42. Jones RB, Rabinovitch RA, Katz BP, Batteiger BE, Quinn TS, Terho P, et al. *Chlamydia trachomatis* in the pharynx and rectum of heterosexual patients at risk for genital infection. *Ann Intern Med.* junio de 1985;102(6):757-62.
43. Kalayoglu MV. Ocular chlamydial infections: pathogenesis and emerging treatment strategies. *Curr Drug Targets Infect Disord.* marzo de 2002;2(1):85-91.
44. O'Farrell N, Morison L, Moodley P, Pillay K, Vanmali T, Quigley M, et al. Genital ulcers and concomitant complaints in men attending a sexually transmitted infections clinic: implications for sexually transmitted infections management. *Sex Transm Dis.* junio de 2008;35(6):545-9.
45. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* julio de 2011;24(3):498-514.
46. Andersen B, Sokolowski I, Østergaard L, Kjølseth Møller J, Olesen F, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. *Sex Transm Infect.* junio de 2007;83(3):237-41.

47. Manhart LE, Holmes KK, Hughes JP, Houston LS, Totten PA. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health*. junio de 2007;97(6):1118-25.
48. Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, Khosropour CM, Colombara DV, Golden MR, et al. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. abril de 2013;56(7):934-42.
49. Jernberg E, Moghaddam A, Moi H. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. *Int J STD AIDS*. octubre de 2008;19(10):676-9.
50. Bradshaw CS, Chen MY, Fairley CK. Persistence of *Mycoplasma genitalium* following azithromycin therapy. *PloS One*. 2008;3(11):e3618.
51. Terada M, Izumi K, Ohki E, Yamagishi Y, Mikamo H. Antimicrobial efficacies of several antibiotics against uterine cervicitis caused by *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. junio de 2012;18(3):313-7.
52. Manhart LE, Khosropour CM, Gillespie CW, Lowens MS, Golden MR, Totten PA. Treatment Outcomes For Persistent *Mycoplasma Genitalium*-Associated NGU: Evidence of Moxifloxacin Treatment Failures. *Sex Transm Infect*. 1 de julio de 2013;89(Suppl 1):A29-A29.
53. Couldwell DL, Tagg KA, Jeffreys NJ, Gilbert GL. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int J STD AIDS*. octubre de 2013;24(10):822-8.
54. Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol*. julio de 2013;51(7):2245-9.
55. Centers for Disease Control and Prevention. Syphilis - CDC Fact Sheet (Detailed) [Internet]. CDC; 2017 [citado 2 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-syphilis-detailed.htm>.
56. Kimberlin DW, Rouse DJ. Clinical practice. Genital herpes. *N Engl J Med*. 6 de mayo de 2004;350(19):1970-7.

57. Fanfair RN, Zaidi A, Taylor LD, Xu F, Gottlieb S, Markowitz L. Trends in seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among non-Hispanic blacks and non-Hispanic whites aged 14 to 49 years--United States, 1988 to 2010. *Sex Transm Dis.* noviembre de 2013;40(11):860-4.
58. Garcia ML. Sexually Transmitted Diseases. *Yale J Biol Med.* junio de 2009;82(2):93.
59. Centers for Disease Control and Prevention. Genital Herpes - CDC Fact Sheet (Detailed) [Internet]. CDC; 2017 [citado 15 de enero de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/herpes/stdfact-herpes-detailed.htm>.
60. Wald A, Huang M-L, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2003;188(9):1345-51.
61. Van Wagoner NJ, Hook EW. Herpes diagnostic tests and their use. *Curr Infect Dis Rep.* abril de 2012;14(2):175-84.
62. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 20 de junio de 2004;324(1):17-27.
63. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MCB, et al. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis.* marzo de 2013;40(3):187-93.
64. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* 15 de junio de 2000;151(12):1158-71.
65. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* abril de 2005;6(4):204.
66. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV Infection - Fact Sheet [Internet]. CDC; 2017 [citado 20 enero de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>.

67. Myer L, Kuhn L, Stein ZA, Wright TC, Denny L. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. *Lancet Infect Dis*. diciembre de 2005;5(12):786-94.
68. Sutton M, Sternberg M, Koumans EH, McQuillan G, Berman S, Markowitz L. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de noviembre de 2007;45(10):1319-26.
69. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect*. septiembre de 2013;89(6):426-33.
70. Nye MB, Schwebke JR, Body BA. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. *Am J Obstet Gynecol*. febrero de 2009;200(2):188.e1-7.
71. Huppert JS, Mortensen JE, Reed JL, Kahn JA, Rich KD, Miller WC, et al. Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de julio de 2007;45(2):194-8.
72. Hollman D, Coupey SM, Fox AS, Herold BC. Screening for *Trichomonas vaginalis* in high-risk adolescent females with a new transcription-mediated nucleic acid amplification test (NAAT): associations with ethnicity, symptoms, and prior and current STIs. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. octubre de 2010;23(5):312-6.
73. Roth AM, Williams JA, Ly R, Curd K, Brooks D, Arno J, et al. Changing sexually transmitted infection screening protocol will result in improved case finding for *trichomonas vaginalis* among high-risk female populations. *Sex Transm Dis*. mayo de 2011;38(5):398-400.
74. Centers for Disease Control and Prevention. Chancroid [Internet]. CDC; 2015 [citado 28 enero de 2015]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/chancroid.htm>.
75. Lewis DA. Chancroid: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Sex Transm Infect*. febrero de 2003;79(1):68-71.

76. Lockett AE, Dance DA, Mabey DC, Drasar BS. Serum-free media for isolation of *Haemophilus ducreyi*. *Lancet Lond Engl*. 3 de agosto de 1991;338(8762):326.
77. Shimose L, Munoz-Price LS. Diagnosis, prevention, and treatment of scabies. *Curr Infect Dis Rep*. octubre de 2013;15(5):426-31.
78. Monsel G, Chosidow O. Management of scabies. *Skin Ther Lett*. marzo de 2012;17(3):1-4.
79. Centers for Disease Control and Prevention. Molluscum contagiosum [Internet]. CDC; 2015 [citado 3 marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/poxvirus/molluscum-contagiosum/>.
80. Tohme RA, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology Baltim Md*. octubre de 2010;52(4):1497-505.
81. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology Baltim Md*. marzo de 2013;57(3):881-9.
82. Centers for Disease Control and Prevention. Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians [Internet]. [citado 3 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6218a5.htm>
83. Alter HJ, Purcell RH, Gerin JL, London WT, Kaplan PM, McAuliffe VJ, et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun*. junio de 1977;16(3):928-33.
84. Villarejos VM, Visoná KA, Gutiérrez A, Rodríguez A. Role of saliva, urine and feces in the transmission of type B hepatitis. *N Engl J Med*. 26 de diciembre de 1974;291(26):1375-8.
85. Davis LG, Weber DJ, Lemon SM. Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet Lond Engl*. 22 de abril de 1989;1(8643):889-93.
86. Martinson FE, Weigle KA, Royce RA, Weber DJ, Suchindran CM, Lemon SM. Risk factors for horizontal transmission of hepatitis B virus in a rural district in Ghana. *Am J Epidemiol*. 1 de marzo de 1998;147(5):478-87.

87. Thompson ND, Perz JF, Moorman AC, Holmberg SD. Nonhospital health care-associated hepatitis B and C virus transmission: United States, 1998-2008. *Ann Intern Med.* 6 de enero de 2009;150(1):33-9.
88. Busch K, Thimme R. Natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Med Microbiol Immunol (Berl).* febrero de 2015;204(1):5-10.
89. Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* abril de 1995;20(4):992-1000.
90. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol.* diciembre de 2005;34(6):1329-39.
91. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatol Baltim Md.* septiembre de 2009;50(3):661-2.
92. Centers for Disease Control and Prevention. A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: Immunization of Adults [Internet]. [citado 3 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5516a1.htm>
93. Centers for Disease Control and Prevention. A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part 1: Immunization of Infants, Children, and Adolescents [Internet]. [citado 3 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5416a1.htm>
94. Lemon SM. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *N Engl J Med.* 24 de octubre de 1985;313(17):1059-67.
95. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Prevention of Hepatitis A After Exposure to Hepatitis A Virus and in International Travelers. Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [Internet]. [citado 3 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5641a3.htm>

96. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Hepatitis A Through Active or Passive Immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [Internet]. [citado 3 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5507a1.htm>
97. Cook GC. The Scars of Venus: a history of venereology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de marzo de 1995;89(2):240-240.
98. Lewis DA. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect.* noviembre de 2010;86(6):415-21.
99. Young HH, Hill JH, Scott WW. The treatment of infections and infectious diseases with mercurochrome-220 soluble. *Arch Surg.* 1 de mayo de 1925;10(3):813-924.
100. Cumberbatch EP, Robinson CA. Treatment of gonococcal infection by diathermy. *Br Med J.* 14 de julio de 1923;2(3263):54-6.
101. Warren SL, Wilson KM. The treatment of gonococcal infections by artificial (general) hyperthermia. *Am J Obstet Gynecol.* 1 de octubre de 1932;24(4):592-8.
102. Desjardins AU, Stuhler LG, Popp WC. Fever therapy for gonococcic infections. *J Am Med Assoc.* 16 de marzo de 1935;104(11):873-8.
103. Hench PS, Slocumb CH, Popp WC. Fever therapy: results for gonorrhoeal arthritis, chronic infectious (atrophic) arthritis, and other forms of rheumatism. *J Am Med Assoc.* 18 de mayo de 1935;104(20):1779-90.
104. Potter J, Redewill F, Longley E. Hyperpyrexia as an adjunct in the treatment of nonsurgical urologic conditions. *J Urol.* 1937;37:214-25.
105. Bierman W, Levenson C. The treatment of gonorrhoea arthritis by means of systemic and additional focal heating. *Am J Med Sci.* 1936;191:55-65.
106. Simmons E. Value of fever therapy in the arthritides. *Am J Med Sci.* 1937;194:170-8.
107. Cokkinis A, McElligott G, Cokkinis AJ, McElligott GL. Sulfanilamide in gonorrhoea. An analysis of 633 cases. *Lancet.* 1938;2:355-62. *Lancet.* 1938;2:355-62.
108. Kampmeier RH. Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhoea. *Sex Transm Dis.* junio de 1983;10(2):81-4.

109. Slyke CJV, Wolcott RR, Mahoney JF. The chemotherapy of gonococccic infections. J Am Med Assoc. 25 de enero de 1941;116(4):276-80.
110. Uhle C a. W, Latowsky LW, Knight F. Gonorrhoeal urethritis in the male: treatment with sulfapyridine and sulfathiazole. J Am Med Assoc. 26 de julio de 1941;117(4):247-9.
111. Mahoney JF, Van Slyke C, Wolcott RR. Sulfathiazole treatment of gonococcal infections in men and women. Results in 360 patients. Vener Dis Inf. 1941;22:425-31. Vener Inf. 22(12):425-31.
112. Dunlop EMC. Gonorrhoea and the Sulphonamides. Br J Vener Dis. junio de 1949;25(2):81-3.
113. Lawrence A, Phillips I, Nicol C. Various regimens of trimethoprim-sulfamethoxazole used in the treatment of gonorrhoea. J Infect Dis. noviembre de 1973;128:Suppl:673-678 p.
114. Tapsall JW. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 de agosto de 2005;41 Suppl 4:S263-8.
115. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Expert Rev Anti Infect Ther. septiembre de 2009;7(7):821-34.
116. Wainwright M, Swan HT. C.G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. Med Hist. enero de 1986;30(1):42-56.
117. Mahoney JF, Ferguson C, Buchholtz M, Van Slyke C. Mahoney JF, Ferguson C, Buchholtz M, van Slyke CJ. The use of penicillin sodium in the treatment of sulfonamide-resistant gonorrhoea in men. A preliminary report. Am J Gonorr Vener Dis. 1943;27:525-8. Am J Gonorr Vener Dis. 1943;27(5):525-8.
118. Sternberg TH, Turner TB. The treatment of sulfonamide resistant gonorrhoea with penicillin sodium: results in 1,686 cases. J Am Med Assoc. 16 de septiembre de 1944;126(3):157-61.
119. Van Slyke CJ, Arnold RC, Buchholtz M. Penicillin Therapy in Sulfonamide-Resistant Gonorrhoea in Men. Am J Public Health Nations Health. diciembre de 1943;33(12):1392-4.

120. Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci.* agosto de 2011;1230:E19-28.
121. Amies CR. Development of resistance of gonococci to penicillin: an eight-year study. *Can Med Assoc J.* 7 de enero de 1967;96(1):33-5.
122. Franks AG. Successful combined treatment of penicillin-resistant gonorrhea. *Am J Med Sci.* mayo de 1946;211:553-5.
123. Ashford WA, Golash RG, Hemming VG. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet Lond Engl.* 25 de septiembre de 1976;2(7987):657-8.
124. Percival A, Rowlands J, Corkill JE, Alergant CD, Arya OP, Rees E, et al. Penicillinase-producing Gonococci in Liverpool. *Lancet Lond Engl.* 25 de diciembre de 1976;2(8000):1379-82.
125. Phillips I. Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet Lond Engl.* 25 de septiembre de 1976;2(7987):656-7.
126. Faruki H, Sparling PF. Genetics of resistance in a non-beta-lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* diciembre de 1986;30(6):856-60.
127. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiol.* diciembre de 2012;7(12):1401-22.
128. Reyn A, Korner B, Bentzon MW. Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *Br J Vener Dis.* diciembre de 1958;34(4):227-39.
129. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 1986;30(5):664-70.
130. Easmon CS, Forster GE, Walker GD, Ison CA, Harris JR, Munday PE. Spectinomycin as initial treatment for gonorrhoea. *Br Med J Clin Res Ed.* 20 de octubre de 1984;289(6451):1032-4.

131. Judson FN, Ehret JM, Handsfield HH. Comparative study of ceftriaxone and spectinomycin for treatment of pharyngeal and anorectal gonorrhoea. *JAMA*. 8 de marzo de 1985;253(10):1417-9.
132. Stolz E, Zwart HG, Michel MF. Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*. agosto de 1975;51(4):257-64.
133. Ashford WA, Potts DW, Adams HJ, English JC, Johnson SR, Biddle JW, et al. Spectinomycin-resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet Lond Engl*. 7 de noviembre de 1981;2(8254):1035-7.
134. Boslego JW, Tramont EC, Takafuji ET, Diniega BM, Mitchell BS, Small JW, et al. Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *N Engl J Med*. 30 de julio de 1987;317(5):272-8.
135. Ison CA, Littleton K, Shannon KP, Easmon CS, Phillips I. Spectinomycin resistant gonococci. *Br Med J Clin Res Ed*. 17 de diciembre de 1983;287(6408):1827-9.
136. Lee H, Unemo M, Kim HJ, Seo Y, Lee K, Chong Y. Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *J Antimicrob Chemother*. septiembre de 2015;70(9):2536-42.
137. Moran JS, Levine WC. Drugs of choice for the treatment of uncomplicated gonococcal infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. abril de 1995;20 Suppl 1:S47-65.
138. Moran JS. Treating uncomplicated *Neisseria gonorrhoeae* infections: is the anatomic site of infection important? *Sex Transm Dis*. febrero de 1995;22(1):39-47.
139. Gransden WR, Warren CA, Phillips I, Hodges M, Barlow D. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet Lond Engl*. 6 de enero de 1990;335(8680):51.
140. Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, Saika T. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. *J Clin Microbiol*. febrero de 2000;38(2):521-5.

141. Tanaka M, Kumazawa J, Matsumoto T, Kobayashi I. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Japan. *Genitourin Med.* abril de 1994;70(2):90-3.
142. Centers for Disease Control and Prevention. Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* abril de 2007;56(14):332-6.
143. Brown ST, Pedersen HB, Holmes KK. Comparison of erythromycin base and estolate in gonococcal urethritis. *JAMA.* 26 de septiembre de 1977;238(13):1371-3.
144. Dillon J-AR, Trecker MA, Thakur SD, Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program Network in Latin America and Caribbean 1990-2011. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. *Sex Transm Infect.* diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv36-41.
145. Lahra MM, Lo Y-R, Whiley DM. Gonococcal antimicrobial resistance in the Western Pacific Region. *Sex Transm Infect.* diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv19-23.
146. Kubanova A, Kubanov A, Frigo N, Solomka V, Semina V, Vorobyev D, et al. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)--resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009-2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. *BMC Infect Dis.* 19 de junio de 2014;14:342.
147. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2010;54(9):3812-6.
148. Palmer HM, Young H, Winter A, Dave J. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2008;62(3):490-4.
149. Starnino S, Stefanelli P, *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* junio de 2009;63(6):1200-4.

150. Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First Three *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with High-Level Resistance to Azithromycin in Sweden: a Threat to Currently Available Dual-Antimicrobial Regimens for Treatment of Gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2014;58(1):624-5.
151. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MVC, Wasserman GM, et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* marzo de 2012;54(6):841-3.
152. Allen VG, Seah C, Martin I, Melano RG. Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2014;58(5):2528-34.
153. Stevens K, Zaia A, Tawil S, Bates J, Hicks V, Whiley D, et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Australia. *J Antimicrob Chemother.* abril de 2015;70(4):1267-8.
154. Galarza PG, Abad R, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, Oviedo C, et al. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* abril de 2010;54(4):1652-3.
155. Yuan L-F, Yin Y-P, Dai X-Q, Pearline RV, Xiang Z, Unemo M, et al. Resistance to azithromycin of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from 2 cities in China. *Sex Transm Dis.* agosto de 2011;38(8):764-8.
156. Cole MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Pitt R, Grigorjev V, Unemo M. Is the tide turning again for cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe? Results from the 2013 European surveillance. *BMC Infect Dis.* 2015;15:321.
157. World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO Press; 2016.
158. Centers for Disease Control and Prevention. 2015 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines [Internet]. CDC; 2016 [Internet]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/gonorrhea.htm>.
159. Akasaka S, Muratani T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, Matsumoto T. Emergence of cephem- and aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that

- does not produce beta-lactamase. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* marzo de 2001;7(1):49-50.
160. Tanaka M, Nakayama H, Tunoe H, Egashira T, Kanayama A, Saika T, et al. A remarkable reduction in the susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to cepheems and the selection of antibiotic regimens for the single-dose treatment of gonococcal infection in Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* marzo de 2002;8(1):81-6.
 161. Chisholm SA, Mouton JW, Lewis DA, Nichols T, Ison CA, Livermore DM. Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother.* octubre de 2010;65(10):2141-8.
 162. Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Ishida K-I, Ito M, Ishihara S, et al. Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200 mg cefixime at a 6-h interval. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* marzo de 2003;9(1):35-9.
 163. Ito M, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, et al. Remarkable increase in central Japan in 2001-2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2004;48(8):3185-7.
 164. Yokoi S, Deguchi T, Ozawa T, Yasuda M, Ito S, Kubota Y, et al. Threat to cefixime treatment for gonorrhea. *Emerg Infect Dis.* agosto de 2007;13(8):1275-7.
 165. Japanese Society of Sexually Transmitted Infection. Gonococcal infection. Sexually transmitted infections, diagnosis and treatment guidelines 2011. *Jpn J Sex Transm Dis.* 2011;22(Suppl 1):52-9.
 166. Golparian D, Natarajan U, Alexander S, Hughes G, Jones L, Unemo M. First global case of gonorrhea treatment failure with dual antimicrobial therapy (ceftriaxone [500 mg] and azithromycin [1 g]) – the continuously evolving superbug. *Neisseria gonorrhoeae* escapes last resort of treatment. Submitted.
 167. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infect Dis.* 2015;15:364.

168. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhoea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone ▽. *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2011;55(7):3538-45.
169. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother.* marzo de 2012;56(3):1273-80.
170. Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 2012;67(8):1858-60.
171. Shimuta K, Unemo M, Nakayama S-I, Morita-Ishihara T, Dorin M, Kawahata T, et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: intensified surveillance after identification of the first strain (HO41) with high-level ceftriaxone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 2013;57(11):5225-32.
172. Unemo M, Del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. *Microbiol Spectr.* junio de 2016;4(3).
173. Furuya R, Onoye Y, Kanayama A, Saika T, Iyoda T, Tatewaki M, et al. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* octubre de 2007;13(5):302-4.
174. Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents.* enero de 2006;27(1):20-6.
175. Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E, Takahashi C, Oya H, Kuroki T, et al. Spread of a Chromosomal Cefixime-Resistant penA Gene among Different *Neisseria gonorrhoeae* Lineages. *Antimicrob Agents Chemother.* marzo de 2010;54(3):1060-7.

176. Hamilton HL, Dillard JP. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol.* enero de 2006;59(2):376-85.
177. Sox TE, Mohammed W, Sparling PF. Transformation-derived *Neisseria gonorrhoeae* plasmids with altered structure and function. *J Bacteriol.* mayo de 1979;138(2):510-8.
178. Kunz AN, Begum AA, Wu H, D'Ambrozio JA, Robinson JM, Shafer WM, et al. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *J Infect Dis.* 15 de junio de 2012;205(12):1821-9.
179. Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Mol Microbiol.* octubre de 2008;70(2):462-78.
180. Fermer C, Kristiansen BE, Sköld O, Swedberg G. Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species. *J Bacteriol.* agosto de 1995;177(16):4669-75.
181. Johnson SR, Morse SA. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: genetics and mechanisms of resistance. *Sex Transm Dis.* diciembre de 1988;15(4):217-24.
182. Swedberg G, Fermér C, Sköld O. Point mutations in the dihydropteroate synthase gene causing sulfonamide resistance. *Adv Exp Med Biol.* 1993;338:555-8.
183. Roberts M, Elwell LP, Falkow S. Molecular characterization of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* agosto de 1977;131(2):557-63.
184. Powell AJ, Tomberg J, Deacon AM, Nicholas RA, Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem.* 9 de enero de 2009;284(2):1202-12.
185. Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in ponA, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, penC, are required for high-level

- chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* marzo de 2002;46(3):769-77.
186. Spratt BG, Bowler LD, Zhang QY, Zhou J, Smith JM. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. *J Mol Evol.* febrero de 1992;34(2):115-25.
 187. Barbour AG. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 1981;19(2):316-22.
 188. Ohneck EA, Zalucki YM, Johnson PJT, Dhulipala V, Golparian D, Unemo M, et al. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in *Neisseria gonorrhoeae*. *mBio.* 2011;2(5).
 189. Folster JP, Johnson PJT, Jackson L, Dhulipali V, Dyer DW, Shafer WM. MtrR modulates rpoH expression and levels of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* enero de 2009;191(1):287-97.
 190. Zhao S, Duncan M, Tomberg J, Davies C, Unemo M, Nicholas RA. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2009;53(9):3744-51.
 191. Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J Bacteriol.* abril de 2006;188(7):2300-8.
 192. Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2002;46(9):2811-20.
 193. Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. *Biochemistry (Mosc).* 21 de septiembre de 2010;49(37):8062-70.

194. Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* octubre de 2005;49(10):4327-34.
195. Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in *Neisseria spp.* due to mutations in 16S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2000;44(5):1365-6.
196. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother.* junio de 2009;63(6):1142-51.
197. Unemo M, Golparian D, Skogen V, Olsen AO, Moi H, Syversen G, et al. *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin due to a novel resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2013;57(2):1057-61.
198. Ilina EN, Malakhova MV, Bodoev IN, Oparina NY, Filimonova AV, Govorun VM. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Microbiol.* 2013;4:186.
199. Davies C, Bussiere DE, Golden BL, Porter SJ, Ramakrishnan V, White SW. Ribosomal proteins S5 and L6: high-resolution crystal structures and roles in protein synthesis and antibiotic resistance. *J Mol Biol.* 19 de junio de 1998;279(4):873-88.
200. Belland RJ, Morrison SG, Ison C, Huang WM. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of gyrA and parC in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol.* octubre de 1994;14(2):371-80.
201. Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Antolín I, Borrell N, Cacho J, et al. Molecular characterization of ciprofloxacin resistance of gonococcal strains in Spain. *Sex Transm Dis.* mayo de 2003;30(5):395-8.

202. Lindbäck E, Rahman M, Jalal S, Wretling B. Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* septiembre de 2002;110(9):651-7.
203. Douthwaite S, Champney WS. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2001;48 Suppl T1:1-8.
204. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, et al. Erythromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* and Oral Commensal *Neisseria* spp. Carry Known rRNA Methylase Genes. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 1999;43(6):1367-72.
205. Cousin SL, Whittington WLH, Roberts MC. Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* enero de 2003;51(1):131-3.
206. Allen VG, Farrell DJ, Rebbapragada A, Tan J, Tijet N, Perusini SJ, et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2011;55(2):703-12.
207. Ng L-K, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA Associated with Macrolide Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2002;46(9):3020-5.
208. Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiol Read Engl.* marzo de 1995;141 (Pt 3):611-22.
209. Veal WL, Nicholas RA, Shafer WM. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* octubre de 2002;184(20):5619-24.
210. Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* noviembre de 2005;56(5):856-60.

211. Luna VA, Cousin S, Whittington WL, Roberts MC. Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2000;44(9):2503-6.
212. Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R, Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 2007;51(6):2117-22.
213. Osaka K, Takakura T, Narukawa K, Takahata M, Endo K, Kiyota H, et al. Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* junio de 2008;14(3):195-203.
214. Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 2006;50(11):3638-45.
215. Tomberg J, Unemo M, Ohnishi M, Davies C, Nicholas RA. Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the *penA* gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain HO41. *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2013;57(7):3029-36.
216. Unemo M, Dillon J-AR. Review and international recommendation of methods for typing *neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev.* julio de 2011;24(3):447-58.
217. Lee S-G, Lee H, Jeong SH, Yong D, Chung GT, Lee YS, et al. Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* abril de 2010;65(4):669-75.
218. Bignell C, Unemo M, European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* febrero de 2013;24(2):85-92.

219. Bignell C, Fitzgerald M, Guideline Development Group, British Association for Sexual Health and HIV UK. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. octubre de 2011;22(10):541-7.
220. World Health Organization. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, p 1–36. Geneva: WHO Press; 2012.
221. Centers for Disease Control and Prevention. Cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* public health response plan, p 1–43. Atlanta, GA: CDC; 2012.
222. European Centre for Disease Prevention and Control. Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe, p 1–23. Stockholm: ECDC; 2012.
223. Starnino S, GASP-LAC Working Group, Galarza P, Carvallo MET, Benzaken AS, Ballesteros AM, et al. Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility trends (2000-2009) in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from countries in Latin America and the Caribbean shows evolving resistance to ciprofloxacin, azithromycin and decreased susceptibility to ceftriaxone. *Sex Transm Dis*. octubre de 2012;39(10):813-21.
224. Ndowa FJ, Francis JM, Machiha A, Faye-Kette H, Fonkoua MC. Gonococcal antimicrobial resistance: perspectives from the African region. *Sex Transm Infect*. diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv11-15.
225. Unemo M, Ison CA, Cole M, Spiteri G, van de Laar M, Khotenashvili L. Gonorrhoea and gonococcal antimicrobial resistance surveillance networks in the WHO European Region, including the independent countries of the former Soviet Union. *Sex Transm Infect*. diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv42-46.
226. Unemo M, Shipitsyna E, Domeika M, Eastern European Sexual and Reproductive Health (EE SRH) Network Antimicrobial Resistance Group. Gonorrhoea surveillance, laboratory diagnosis and antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* in 11 countries of the eastern part of the WHO European region. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. septiembre de 2011;119(9):643-9.
227. Ison CA, Deal C, Unemo M. Current and future treatment options for gonorrhoea. *Sex Transm Infect*. diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv52-56.

228. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis.* marzo de 2010;37(3):169-72.
229. Chisholm SA, Quaye N, Cole MJ, Fredlund H, Hoffmann S, Jensen JS, et al. An evaluation of gentamicin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe. *J Antimicrob Chemother.* marzo de 2011;66(3):592-5.
230. Dowell D, Kirkcaldy RD. Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J.* marzo de 2013;89(1049):142-7.
231. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, Jensen JS, Unemo M. In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against a large collection of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains, including those with high-level antimicrobial resistance: potential treatment option for gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2012;56(5):2739-42.
232. Hook EW, Golden M, Jamieson BD, Dixon PB, Harbison HS, Lowens S, et al. A Phase 2 Trial of Oral Solithromycin 1200 mg or 1000 mg as Single-Dose Oral Therapy for Uncomplicated Gonorrhea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de octubre de 2015;61(7):1043-8.
233. Unemo M, Golparian D, Limnios A, Whiley D, Ohnishi M, Lahra MM, et al. In vitro activity of ertapenem versus ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae* isolates with highly diverse ceftriaxone MIC values and effects of ceftriaxone resistance determinants: ertapenem for treatment of gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2012;56(7):3603-9.
234. Li L-H, Yen M-Y, Ho C-C, Wu P, Wang C-C, Maurya PK, et al. Non-cytotoxic nanomaterials enhance antimicrobial activities of cefmetazole against multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *PloS One.* 2013;8(5):e64794.
235. Golparian D, Shafer WM, Ohnishi M, Unemo M. Importance of Multidrug Efflux Pumps in the Antimicrobial Resistance Property of Clinical Multidrug-Resistant Isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 2014;58(6):3556-9.

236. Wang Y, Venter H, Ma S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Curr Drug Targets*. 2016;17(6):702-19.
237. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. febrero de 2010;58(1):15-25.
238. Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internet-based screening program. *J Clin Microbiol*. junio de 2009;47(6):1663-7.
239. Hobbs MM, van der Pol B, Totten P, Gaydos CA, Wald A, Warren T, et al. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis*. enero de 2008;35(1):8-13.
240. Taylor SN, DiCarlo RP, Martin DH. Comparison of methylene blue/gentian violet stain to Gram's stain for the rapid diagnosis of gonococcal urethritis in men. *Sex Transm Dis*. noviembre de 2011;38(11):995-6.
241. Thayer JD, Martin JE. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Rep*. junio de 1966;81(6):559-62.
242. Faur YC, Weisburd MH, Wilson ME, May PS. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). I. Formulation and comparisons with standard media. *Health Lab Sci*. abril de 1973;10(2):44-54.
243. Mirrett S, Reller LB, Knapp JS. *Neisseria gonorrhoeae* strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. *J Clin Microbiol*. julio de 1981;14(1):94-9.
244. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. Vol. 32. Wayne, PA: CLSI; 2015.

245. Tapsall JW, Cheng JK. Rapid identification of pathogenic species of *Neisseria* by carbohydrate degradation tests. Importance of glucose in media used for preparation of inocula. *Br J Vener Dis.* agosto de 1981;57(4):249-52.
246. Dillon JR, Carballo M, Pauzé M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitex, Gonocheck II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva MicroTrak Test. *J Clin Microbiol.* marzo de 1988;26(3):493-7.
247. Alexander S, Ison C. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol.* septiembre de 2005;54(Pt 9):827-31.
248. Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J Mol Diagn JMD.* enero de 2009;11(1):75-86.
249. Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, Markowitz L, Papp JR, Palella FJ, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *J Clin Microbiol.* mayo de 2010;48(5):1827-32.
250. Mimiaga MJ, Helms DJ, Reisner SL, Grasso C, Bertrand T, Mosure DJ, et al. Gonococcal, chlamydia, and syphilis infection positivity among MSM attending a large primary care clinic, Boston, 2003 to 2004. *Sex Transm Dis.* agosto de 2009;36(8):507-11.
251. Schachter J, Moncada J, Liska S, Shayevich C, Klausner JD. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sex Transm Dis.* julio de 2008;35(7):637-42.
252. Alexander S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? *Sex Transm Infect.* junio de 2009;85(3):159-60.
253. Whiley DM, Garland SM, Harnett G, Lum G, Smith DW, Tabrizi SN, et al. Exploring «best practice» for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Health.* marzo de 2008;5(1):17-23.

254. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: CLSI; 2016.
255. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. [Internet]. EUCAST; 2016 [Internet]. Disponible en: <http://www.eucast.org>.
256. Dillon J-AR, Starnino S. Manual de laboratorio: identificación y evaluación de la susceptibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a los antibióticos para el programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos en America Latina y el Caribe (GASP-LAC). 2.^a ed. Canadá: University of Saskatchewan; 2011.
257. Bell SM. The CDS disc method of antibiotic sensitivity testing (calibrated dichotomous sensitivity test). Pathology (Phila). octubre de 1975;7(4 Suppl):Suppl 1-48.
258. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob Agents Chemother. abril de 1972;1(4):283-8.
259. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. mayo de 1984;37(1):67-75.
260. O'Rourke M, Ison CA, Renton AM, Spratt BG. Opa-typing: a high-resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. Mol Microbiol. septiembre de 1995;17(5):865-75.
261. Khaki P, Bhalla P, Fayaz AM, Moradi Bidhendi S, Esmailzadeh M, Sharma P. Molecular Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates by Opa-Typing and Ribotyping in New Delhi, India. Int J Microbiol. 2009;2009:934823.
262. Chen H, Wu Z, Chen R, Xu L, Yu Y, Shuai J, et al. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Opa and NG-MAST gene of 12 pairs of sexual contact gonorrhea patients in China. J Huazhong Univ Sci Technol. agosto de 2008;28(4):472-5.
263. Moodley P, Martin IMC, Ison CA, Sturm AW. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* reveals rapid reinfection in rural South Africa. J Clin Microbiol. diciembre de 2002;40(12):4567-70.

264. Komolafe AJ, Sugunendran H, Corkill JE. Gonorrhoea: test of cure for sensitive bacteria? Use of genotyping to disprove treatment failure. *Int J STD AIDS*. marzo de 2004;15(3):212.
265. Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim DF, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 25 de noviembre de 2010;15(47).
266. Unemo M, Sjöstrand A, Akhras M, Gharizadeh B, Lindbäck E, Pourmand N, et al. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* identifies transmission and resistance of one ciprofloxacin-resistant strain. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. marzo de 2007;115(3):231-41.
267. Tazi L, Pérez-Losada M, Gu W, Yang Y, Xue L, Crandall KA, et al. Population dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* in Shanghai, China: a comparative study. *BMC Infect Dis*. 21 de enero de 2010;10:13.
268. Martin IMC, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Spratt BG. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2004;189(8):1497-505.
269. Palmer HM, Young H, Graham C, Dave J. Prediction of antibiotic resistance using *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. *Sex Transm Infect*. agosto de 2008;84(4):280-4.
270. Whiley DM, Goire N, Ray ES, Limnios A, Lambert SB, Nissen MD, et al. *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing using non-cultured clinical specimens. *Sex Transm Infect*. febrero de 2010;86(1):51-5.
271. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 17 de enero de 2013;18(3).
272. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*. diciembre de 1999;7(12):482-7.

273. Viscidi RP, Demma JC. Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* Housekeeping Genes. J Clin Microbiol. enero de 2003;41(1):197-204.
274. Vidovic S, Horsman G, Dillon JR. Novel gonococcal multilocus sequence typing (MLST) scheme suitable for short- and long-term molecular epidemiology studies, abstr. OE34. Abstr. 17th Int. Pathogenic *Neisseria* Conf., Banff. Alberta, Canadá; 2010.
275. Heymans R, Schouls LM, van der Heide HGJ, Schim van der Loeff MF, Bruisten SM. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. enero de 2011;49(1):354-63.
276. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard- Eleven edition. M02-A11. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI, Wayne, Pa. Vol 32. No 1. January 2012.
277. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Ninth edition, CLSI. Vol. 32. No.2.212.
278. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Standing Committee on Susceptibility Testing. Version 14.0.; 2015. Disponible en: <http://bsac.org.uk/>.
279. Bala M, Singh V, Philipova I, Bhargava A, Chandra Joshi N, Unemo M. Gentamicin in vitro activity and tentative gentamicin interpretation criteria for the CLSI and calibrated dichotomous sensitivity disc diffusion methods for *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. julio de 2016;71(7):1856-9.
280. Mehaffey PC, Putnam SD, Barrett MS, Jones RN. Evaluation of in vitro spectra of activity of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin tested against strains of *Neisseria gonorrhoeae* by reference agar dilution, disk diffusion, and Etest methods. J Clin Microbiol. febrero de 1996;34(2):479-81.
281. Rea LM, Parker RA. Designing and conducting survey research. A comprehensive guide. 4th edition. October 2004. John Wiley and Sons Ltd.
282. Hopkins WG. A new view of statistics. 2000 [Internet]. Accedido el 06/02/2017. Disponible en: <http://sportsoci.org/resource/stats>.

283. Carbonetti NH, Simnad VI, Seifert HS, So M, Sparling PF. Genetics of protein I of *Neisseria gonorrhoeae*: construction of hybrid porins. Proc Natl Acad Sci U S A. septiembre de 1988;85(18):6841-5.
284. Cornelissen CN, Anderson JE, Sparling PF. Characterization of the diversity and the transferrin-binding domain of gonococcal transferrin-binding protein 2. Infect Immun. febrero de 1997;65(2):822-8.
285. Tribuddharat C, Pongpech P, Charoenwatanachokchai A, Lokpichart S, Srifuengfung S, Sonprasert S. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility and the Prevalence of blaTEM-1 and blaTEM-135 Genes in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from Thailand. Jpn J Infect Dis. 24 de marzo de 2017;70(2):213-5.
286. Nieto M. Dinámica poblacional, características clínicas, sensibilidad antimicrobiana y tipado molecular de la infección gonocócica: estudio clínico y epidemiológico en el área de Bilbao. 2015. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10810/17249>.
287. Dirección general de salud pública, calidad e innovación. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 1995-2013. Madrid, España: 2015.
288. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe. Annual Report No. 3. Stockholm: ECDC; 2008.
289. Vall Mayans M, Sanz Colomo B, Loureiro Varela E, Armengol Egea P. [Sexually transmitted infections in Barcelona beyond 2000]. Med Clin (Barc). 17 de enero de 2004;122(1):18-20.
290. Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, et al. [*Neisseria gonorrhoeae*: antimicrobial resistance and study of population dynamics. Situation in Barcelona in 2011]. Enferm Infecc Microbiol Clin. noviembre de 2013;31(9):579-83.
291. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012-2014. Enferm Infecc Microbiol Clin. enero de 2016;34(1):3-7.
292. Mal PB, Jabeen K, Farooqi J, Unemo M, Khan E. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Pakistan by Etest compared to

- Calibrated Dichotomous Sensitivity and Clinical Laboratory Standards Institute disc diffusion techniques. *BMC Microbiol.* 10 de octubre de 2016;16(1):236.
293. Bala M, Singh V, Bhargava A, Ramesh V. Trends of resistance to antimicrobials recommended currently and in the past for management of gonorrhoea in the Apex STD center in India and comparison of antimicrobial resistance profile between 2002-2006 and 2007-2012. *Sex Transm Dis.* abril de 2015;42(4):218-22.
294. Costa LMB, Pedroso ERP, Vieira Neto V, Souza VCP, Teixeira MJB. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* junio de 2013;46(3):304-9.
295. Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Rodríguez S, Bartolomé-Comas R, Roig G, Juvé R, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Barcelona: penA, ponA, mtrR, and porB mutations and NG-MAST sequence types associated with decreased susceptibility to cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* septiembre de 2016;35(9):1549-56.
296. Cheng C-W, Li L-H, Su C-Y, Li S-Y, Yen M-Y. Changes in the six most common sequence types of *Neisseria gonorrhoeae*, including ST4378, identified by surveillance of antimicrobial resistance in northern Taiwan from 2006 to 2013. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* octubre de 2016;49(5):708-16.
297. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Jeney C, Szabo D, Marschalko M, Karpati S, et al. Emerging azithromycin-resistance among the *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 20 de septiembre de 2016;15(1):53.
298. Lebedzeu F, Golparian D, Titov L, Pankratava N, Glazkova S, Shimanskaya I, et al. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010-2013. *BMC Infect Dis.* 31 de enero de 2015;15:29.
299. Regnath T, Mertes T, Ignatius R. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015: increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 8 de septiembre de 2016;21(36).

300. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2014. Stockholm: ECDC; 2016.
301. Ni C, Xue J, Zhang C, Zhou H, van der Veen S. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 2016;71(8):2355-7.
302. Zou M, Xia Z, Liang X. [Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* epidemic strains in Changsha]. *Hunan Yi Ke Xue Xue Bao Hunan Yike Daxue Xuebao Bull Hunan Med Univ.* 28 de febrero de 2003;28(1):53-5.
303. Wang B, Xu J, Wang C, Mi Z, Pu Y, Hui M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Jiangsu Province, China, with a focus on fluoroquinolone resistance. *J Med Microbiol.* septiembre de 2006;55(Pt 9):1251-5.
304. Afrasiabi S, Moniri R, Samimi M, Mousavi SG. The frequency of *Neisseria gonorrhoeae* endocervical infection among female carrier and changing trends of antimicrobial susceptibility patterns in Kashan, Iran. *Iran J Microbiol.* junio de 2014;6(3):194-7.
305. Liu H, Taylor TH, Pettus K, Johnson S, Papp JR, Trees D. Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:46.
306. Kirkcaldy RD, Harvey A, Papp JR, Del Rio C, Soge OO, Holmes KK, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance - The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. *Morb Mortal Wkly Rep Surveill Summ Wash DC 2002.* 15 de julio de 2016;65(7):1-19.
307. Martin I, Sawatzky P, Liu G, Mulvey M. Antimicrobial resistance to *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: 2009-2013. *CCDR.* 2015;41:S4.
308. Chen S-C, Yin Y-P, Dai X-Q, Unemo M, Chen X-S. Antimicrobial resistance, genetic resistance determinants for ceftriaxone and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Nanjing, China. *J Antimicrob Chemother.* noviembre de 2014;69(11):2959-65.
309. Bala M, Kakran M, Singh V, Sood S, Ramesh V, Members of WHO GASP SEAR Network. Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in

- selected countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: a retrospective analysis. *Sex Transm Infect.* diciembre de 2013;89 Suppl 4:iv28-35.
310. Public Health England. GRASP 2012 Report: The Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme. 2013. Disponible en: http://194.74.226.162/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317140152190 (Accedido el 14/06/2015).
311. Ison CA, Town K, Obi C, Chisholm S, Hughes G, Livermore DM, et al. Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci: data from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP) in England and Wales, 2007-2011. *Lancet Infect Dis.* septiembre de 2013;13(9):762-8.
312. Jeverica S, Golparian D, Matičič M, Potočnik M, Mlakar B, Unemo M. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006-12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J Antimicrob Chemother.* junio de 2014;69(6):1517-25.
313. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT, Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* abril de 2012;30(4):218-9.
314. Bueno S, Wu A, Hess DC, Carlson JS, Rauch L, Philip SS, et al. Using the *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence-typing method to assess strain diversity and antibiotic resistance in San Francisco, California. *Microb Drug Resist Larchmt N.* octubre de 2012;18(5):510-7.
315. Martin I, Sawatzky P, Liu G, Allen V, Lefebvre B, Hoang L, et al. Antimicrobial susceptibilities and distribution of sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Canada: 2010. *Can J Microbiol.* octubre de 2013;59(10):671-8.
316. Shigemura K, Osawa K, Miura M, Tanaka K, Arakawa S, Shirakawa T, et al. Azithromycin resistance and its mechanism in *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hyogo, Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2015;59(5):2695-9.
317. Chen S-C, Yin Y-P, Dai X-Q, Unemo M, Chen X-S. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China. *J Antimicrob Chemother.* enero de 2016;71(1):92-9.

318. Carannante A, Vacca P, Ghisetti V, Latino MA, Cusini M, Matteelli A, et al. Genetic Resistance Determinants for Cefixime and Molecular Analysis of Gonococci Isolated in Italy. *Microb Drug Resist* Larchmt N. marzo de 2017;23(2):247-52.
319. Belkacem A, Jacquier H, Goubard A, Mougari F, La Ruche G, Patey O, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2016;71(9):2471-8.
320. Gose S, Nguyen D, Lowenberg D, Samuel M, Bauer H, Pandori M. *Neisseria gonorrhoeae* and extended-spectrum cephalosporins in California: surveillance and molecular detection of mosaic penA. *BMC Infect Dis.* 4 de diciembre de 2013;13:570.

